



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CONSTRUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA SENSORA DE CALCIO TIPO *EF-HAND* A PARTIR DE UNA PROTEÍNA MODULADORA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
BIOL. EMMA LILIANA ARÉVALO SALINA

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Gloria Saab Rincón
Instituto de Biotecnología-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
Instituto de Biotecnología -UNAM

Dr. Gabriel del Río Guerra
Instituto de Fisiología Celular -UNAM

Cuernavaca, Morelos. Junio, 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.

Este trabajo se realizó bajo la tutoría de la Dra. Gloria Saab Rincón en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de estudios de posgrado con número 379141 y el apoyo a los proyectos CB-176351 (Dr. Joel Osuna), CB-0154194 (Dra. Gloria Saab) y por DGAPA al proyecto PAPIIT IN211414.

AGRADECIMIENTOS

ACADÉMICOS

A la Dra. Gloria Saab Rincón por su apoyo y por ser la guía durante este trabajo.

Al Dr. Joel Osuna Quintero, quien comenzó este proyecto y gracias a quien entré a este mundo de la ciencia.

Al Dr. Humberto Flores Soto por el apoyo técnico durante todo el proyecto, por estar siempre pendiente y dispuesto a apoyarme

A todas aquellas personas que me brindaron asistencia y asesoría técnica: Biol. Filiberto Sánchez López, Dr. Edson Norberto Cárcamo Noriega, Dra. Valeria Guzmán Luna.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Gabriel del Rio Guerra y Dr. Takuya Nishigaki Shimizu.

A los miembros del Jurado: Dr. Lorenzo P. Segovia Forcella, Dra. Marcela Ayala Aceves, Dr. Adrián Ochoa Leyva, Dr. Alfredo Martínez Jiménez y el Dr. Hugo Nájera Peña.

Al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) por el apoyo para la asistencia a congresos nacionales e internacionales.

A la unidad de docencia del IBT-UNAM: Lic. J. Antonio Bolaños Guillen y Gloria Villa Herrera.

Al IBT y la UNAM

PERSONALES

Quiero agradecer y dedicar este trabajo a quienes son mi motor y mi inspiración en la vida: A mis padres, Víctor y Angélica que son un ejemplo de perseverancia y amor. A mis hermanos, Manuel y Fani que con sus ocurrencias me hacen tan feliz. Gracias a todos por su apoyo en todos los aspectos posibles, por su amor y comprensión.

A mis amigos, que hacen que tantos momentos sean aún más bellos, a Omar que aún en la distancia ha sido mi apoyo en tantos momentos, a Caro que ha hecho que la maestría haya sido tan divertida y en quien además encontré una nueva hermana.

A los viejos amigos: Pavel, Nano, Orlando, Pao, Karen, Gabi.

A mis amigos y compañeros de maestría, especialmente a Lula, Daniel, Osvaldo, Esme y Dani.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Edson por su amistad, sus consejos y apoyo técnico durante todo este tiempo, a Brenda, Rodrigo, Lidia, Lety y todos los que forman parte del laboratorio 9.

A la Sra. Lulu, Cris y Luz por hacerme parte de su familia.

Y a todas aquellas personas que han hecho de la maestría una experiencia tan grata.

Gracias

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
PROTEÍNAS SENSORAS DE Ca^{2+}	11
PROTEÍNAS MODULADORAS DE Ca^{2+}	12
ASAS DE UNIÓN A CALCIO	13
APAREAMIENTO EF-HAND	15
AFINIDAD	18
CALBINDINA D_{9k}	20
TROPONINA C	23
ANTECEDENTES	26
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS GENERALES	29
OBJETIVOS PARTICULARES	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
PARTE 1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LOS MOTIVOS INDIVIDUALES HI_{CLBN}SCIII, HIH2_{CLBN}SCIII Y DEL DISEÑO REPORTADO POR JOHANSSON Y COLABORADORES (JOMUT) EN EL CONTEXTO DEL SISTEMA REPORTERO (TYRA)	30
1.-OBTENCIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LAS VARIANTES HI _{CLBN} SCIII, HIH2 _{CLBN} SCIII, JOMUT, Y LOS MOTIVOS CLBN Y SCIII FUSIONADOS AL REPORTERO (TYRA)	30
SOBREEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN PARA PURIFICACIÓN	33

PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	33
ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	34
DETERMINACIÓN DEL GRADO DE OLIGOMERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EF-HAND-TYRA	35
ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS CONFORMACIONALES EN LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR	35
ANÁLISIS DE EXPOSICIÓN DE ZONAS HIDROFÓBICAS MEDIANTE LA INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON ANS	36
PARTE 2. REINSERCIÓN DE LOS MÓDULOS CONSTRUÍDOS A LA PROTEÍNA CALBINDINA D_{9K} Y SU ANÁLISIS	37
OBTENCIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES PARA LAS PROTEÍNAS CALBINDINA D _{9K} REINSERTANDO LOS MOTIVOS CONSTRUÍDOS	37
SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	38
ANÁLISIS DE CAMBIOS EN ESTRUCTURA SECUNDARIA EN RESPUESTA A CALCIO MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR DE LAS PROTEÍNAS CALBINDINA D _{9K} WT Y QUIMERAS	39
ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA EXTRÍNSECA DE LAS PROTEÍNAS EN RESPUESTA A CALCIO	39
<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	40
PARTE 1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LOS MÓDULOS INDIVIDUALES HI_{CLBN}SCIII, HIH2_{CLBN}SCIII, JoMUT, Y LOS MOTIVOS CLBN Y SCIII EN EL CONTEXTO DEL SISTEMA REPORTERO	40
GENES CODIFICANTES PARA LAS VARIANTES HI _{CLBN} SCIII, HIH2 _{CLBN} SCIII, JoMUT, Y LOS MOTIVOS WT CLBN Y SCIII FUSIONADOS A TYRA	40
PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FUSIONADAS	41
ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE TYRA	42
DETERMINACIÓN DE LA OLIGOMERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN	48
ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN LA CONFORMACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN MEDIANTE DICROÍSMO CIRCULAR	50
ANÁLISIS DE EXPOSICIÓN DE ZONAS HIDROFÓBICAS MEDIANTE LA INTERACCIÓN CON ANS	52
PARTE 2. REINSERCIÓN DE LOS MÓDULOS CONSTRUÍDOS A LA PROTEÍNA CALBINDINA D_{9K} Y ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA COMPLETA	54
OBTENCIÓN DE LOS GENES CODIFICANTES DE LAS PROTEÍNAS CALBINDINA D _{9K} REINSERTANDO LOS MÓDULOS CONSTRUÍDOS	54
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS CALBINDINA D _{9K} QUIMERAS	56
ANÁLISIS PARA DETERMINAR SI EXISTE UN CAMBIO CONFORMACIONAL EN LA PROTEÍNA COMPLETA DE CALBINDINA D _{9K} .	56
ANÁLISIS DE FLUORESCENCIA EXTRÍNSECA DE LAS PROTEÍNAS EN RESPUESTA A CALCIO	60
<u>CONCLUSIONES</u>	64

<u>ANEXOS</u>	<u>66</u>
ANEXO 1. CONTRUCCIÓN DE GENES	66
ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVO Y AMORTIGUADORES	69
ANEXO 3. PROTOCOLOS	70
3.1 SOBREENPRESIÓN DE PROTEÍNAS	70
3.2 DIÁLISIS	70
ANEXO 4. RESULTADOS ADICIONALES	71
4.1 ESPECTROS DE FLUORESCENCIA PARA LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN EF-HAND-TYRA	71
4.2 CURVAS Y AJUSTES ENZIMÁTICOS	72
<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>73</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MOTIVO EF-HAND CA^{2+9} . SE MUESTRA LA ESTRUCTURA DE UN MOTIVO EF-HAND UNIDO A UN IÓN CA^{2+} Y SU ANALOGÍA CON UNA MANO.	9
FIGURA 2. DIFERENCIA EN EL CAMBIO CONFORMACIONAL INDUCIDO POR LA UNIÓN DEL CALCIO EN UNA PROTEÍNA MODULADORA Y UNA SENSORA. LA PROTEÍNA MODULADORA CALBINDINA D_{9K} SE MUESTRA EN LA PARTE SUPERIOR Y LA PROTEÍNA SENSORA CALMODULINA EN LA PARTE INFERIOR. EL CAMBIO CONFORMACIONAL INDUCIDO EN LA PROTEÍNA SENSORA PROVOCA UN AUMENTO EN LA SUPERFICIE HIDROFÓBICA ACCESIBLE (EN AMARILLO) ¹¹ .	11
FIGURA 3. INTERACCIÓN EF-HAND- CA^{2+9} . A) INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA CANÓNICA CALMODULINA CON CA^{2+} (1EXR). B) INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA NO CANÓNICA CALBINDINA D_{9K} CON CA^{2+} (3ICB).	14
FIGURA 4. TRANSICIÓN HOLO (SUPERIOR) Y APO (INFERIOR) DEL ANDAMIAJE B ⁸	17
FIGURA 5. CALBINDINA D_{9K} ²⁹ . SE MUESTRA LOS DOS MOTIVOS UNIENDO CADA UNO UN IÓN DE CA^{2+} .	20
FIGURA 6. TROPONINA C. REPRESENTACIÓN EN LISTONES DE LA PROTEÍNA TROPONINA C. SE MUESTRA EL IÓN CA^{2+} Y LAS CADENAS LATERALES DE LOS RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS QUE LO UNE EN EL DOMINIO C-TERMINAL (4TNC).	23
FIGURA 7. DÍMERO SCIII ³³ . SE MUESTRA EL HOMODÍMERO DE LOS MÓDULOS SCIII. SE REPRESENTA LAS HÉLICES COMO CILINDROS Y LOS IONES CA^{2+} COMO ESFERAS.	24
FIGURA 8. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LOS MOTIVOS SCIII, CLBN Y MOTIVOS QUIMÉRICOS ⁴¹ .	26
FIGURA 9. COMPARACIÓN EN LA ACTIVIDAD DE TYRA EN LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y LA PROTEÍNA T. LAS BARRAS BLANCAS REPRESENTA LA ACTIVIDAD OBSERVADA EN AUSENCIA DE EDTA Y CA, LAS BARRAS EN COLOR GRIS REPRESENTAN A LA PROTEÍNA EN PRESENCIA DE 1 MM DE EDTA Y LAS BARRAS EN COLOR NEGRO EN PRESENCIA DE 2 MM DE CA^{2+} 41.	27
FIGURA 10. EF-HAND QUIMÉRICOS. SE MUESTRA UNA REPRESENTACIÓN DE LAS DISTINTAS CONSTRUCCIONES GENERADAS. LAS HÉLICES SE MUESTRAN COMO CILINDROS.	41
FIGURA 11. PROTEÍNAS PURIFICADAS. 1:CLBN-TYRA, 2:SCIII-TYRA, 3: H1 _{CLBN} SCIII.-TYRA 4: H1H2 _{CLBN} SCIII-TYRA Y 5:JOMUT-TYRA	42
FIGURA 12: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE TYRA EN LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN EF-HAND-TYRA. ABSORBANCIA A 340 NM. IZQUIERDA, GRÁFICAS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA CADA PROTEÍNA DE FUSIÓN. DERECHA, CONSUMO DE NAD ⁺ EN LA REACCIÓN. SE MUESTRA EL COMPORTAMIENTO DE LA VARIANTE SIN TRATAMIENTO (NOMBRE DE LA VARIANTE), SIN CA^{2+} (+EDTA) Y CON CALCIO (+ CA^{2+}).	44
FIGURA 13. PERFILES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO.	47
FIGURA 14. CROMATOGRAMAS DE CADA VARIANTE USANDO UNA COLUMNA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR: EN MAGENTA LA PROTEÍNA PURA, EN NEGRO LA PROTEÍNA	

PURA EN PRESENCIA DE 2MM DE CALCIO Y EN NARANJA LA PROTEÍNA PURA CON 1MM DE EDTA	49
FIGURA 15. ESPECTROS DE CD DE LAS DIFERENTES CONSTRUCCIONES FUSIONADAS A TYRA EN PRESENCIA DE 1 MM DE Ca^{2+} (TRAZO NEGRO) Y AUSENCIA (TRAZO ROJO) DE Ca^{2+} .	51
FIGURA 16. ESPECTROS DE EMISIÓN DE LAS VARIANTES PROTEICAS EN PRESENCIA DE 1,8-ANS EN AUSENCIA (LÍNEA NEGRA) Y PRESENCIA DE CALCIO (LÍNEA ROJA).	52
FIGURA 17. ESQUEMA DE LAS CALBINDINAS D_{9K} CON LOS EF-HAND REINSERTADOS QUIMÉRICOS. SE MUESTRAN LAS 5 CONSTRUCCIONES GENERADAS: $CLBD_{9K}$, $CLBD_{9K-SCIII}$, $CLBD_{9K-HI_{CLBN}SCIII}$, Y $CLBD_{9K-HIH2_{CLBN}SCIII}$ Y $CLBD_{9K-JOMUT}$. LAS HÉLICES SE MUESTRAN COMO CILINDROS.	55
FIGURA 18. ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR PARA LAS PROTEÍNAS CALBINDINAS D_{9K} SILVESTRE Y QUIMERAS EN AUSENCIA (TRAZO NEGRO) Y PRESENCIA (TRAZO ROJO) DE CALCIO (1 MM).	57
FIGURA 19. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA EXTRÍNSECA MEDIANTE LA INTERACCIÓN CON ANS EN AUSENCIA (TRAZO NEGRO) Y PRESENCIA (TRAZO ROJO) DE CALCIO. ANÁLISIS DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CALCIO PARA LAS PROTEÍNAS EN LAS QUE SE OBSERVÓ UN COMPORTAMIENTO SENSOR SEGÚN EL SISTEMA REPORTERO.	61
FIGURA 20. ESPECTROS DE EMISIÓN DE LAS VARIANTES PROTEICAS EN PRESENCIA DE 1,8-ANS EN AUSENCIA (LÍNEA OSCURA) Y PRESENCIA DE CALCIO (LÍNEA CLARA).	71

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA VARIANTE $HI_{CLBN}SCIII$ -TYRA.	31
TABLA 2. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA VARIANTE JOMUT.	31
TABLA 3. SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO USADO PARA LA SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.	33
TABLA 4. SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CALBINDINA D_{9K} WT Y LAS VARIANTES	37
TABLA 5. CONCENTRACIONES OBTENIDAS DE LA PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN EF-HAND-TYRA	42
TABLA 6. CONSTANTES DE AFINIDAD REPORTADAS PARA EL SITIO III DE TROPONINA, $CLBN$ Y EL HOMODÍMERO $SCIII$ Y CONSTANTES DE AFINIDAD OBTENIDAS MEDIANTES NUESTRO SISTEMA REPORTERO PARA LOS MÓDULOS $SCIII$, $HI_{CLBN}SCIII$ Y $HIH2_{CLBN}SCIII$.	48

TABLA 7. SECUENCIA DE RESIDUOS AMINOACÍDICOS DE LAS PROTEÍNAS CALBINDINA D_{9k} WT Y LAS VARIANTES CONSTRUIDAS 54

TABLA 8. PORCENTAJE DE HÉLICES A CALCULADO UTILIZANDO EL ALGORITMO SELCON 3 (THE SELF-CONSISTENT METHOD). EL ANÁLISIS FUE REALIZADO PARA AMBAS CONDICIONES. EN AUSENCIA DE CA²⁺ Y PRESENCIA DE CA²⁺. 58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANS	Ácido 8-Anilinaftaleno-1-Sulfónico
BSA	Albúmina sérica bovina
CaM	Calmodulina
CD	Dicroísmo Circular
ClbN	Módulo EF-hand N terminal de la Calbindina D _{9k}
CMB-1	Calbinmodulina. Calbindina D _{9k} con características sensores reportada por Bunick y colaboradores
cTnC	Isoforma de Troponina C de músculo cardiaco-esquelético
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFCaBPs	Proteínas unidoras de Ca ²⁺ tipo EF-hand
EF-hand	Motivo de unión a calcio hélice-asa-hélice
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
JoMut	Calbindina D _{9k} reportada por Johansson y colaboradores
K _d	Constante de afinidad
K _{m_{ap}}	Constante de afinidad aparente determinada mediante el sistema reportero
K _{Mg}	Constante de afinidad a Mg ²⁺
LB	Lysogeny broth
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado/reducido
PPA	Ácido prefénico
SCIII	Módulo EF-hand número 3 dentro de la Troponina C
<i>scIII</i>	Gen que codifica para módulo SCIII
sTnC	Isoforma de Troponina C de músculo esquelético

TnC	Troponina C
TnI	Troponina I
TyrA	Proteína Prefenato Deshidrogenasa
<i>tyrA</i>	Gen que codifica para la enzima Prefenato Deshidrogenasa

RESUMEN

El calcio (Ca^{2+}) es un metal alcalinotérreo y es uno de los elementos más importantes para la vida. En la célula, el calcio se regula por varias proteínas, la mayoría de las cuales pertenecen a la superfamilia de proteínas unidoras de Ca^{2+} conocidas como EF-hand (EFCaBPs). Estas proteínas se caracterizan por tener un motivo hélice-asa-hélice para la unión a calcio (EF-hand). A pesar de la enorme identidad encontrada entre estas proteínas, sus funciones son diversas, lo cual es resultado en parte, de los diferentes cambios estructurales que sufren cuando unen Ca^{2+} así como un ajuste fino de sus propiedades de unión a Ca^{2+} . Las EFCaBPs se dividen en dos clases funcionales: Sensoras de Ca^{2+} y moduladoras de Ca^{2+} , siendo el cambio conformacional inducido por la unión de calcio la característica principal que las distingue. Las proteínas sensoras presentan cambios conformacionales importantes en los ángulos inter-hélices (mayores a 60°) al unir calcio, este cambio conformacional provoca la exposición de superficies hidrofóbicas, lo cual les permite interactuar con sus blancos, y transducir la señal. Por otro lado, las proteínas moduladoras como la Calbindina D_{9k} , muestran cambios conformacionales muy pequeños con la unión a Ca^{2+} (ángulos menores a los 12°). Hemos estudiado el efecto de los elementos estructurales secundarios del motivo EF-hand en el cambio conformacional, utilizando como modelo un EF-hand de la proteína tipo sensor Troponina C (SCIII) y uno de la proteína moduladora Calbindina D_{9k} (ClbN). Para esto se construyeron motivos EF-hand quiméricos que contienen el asa de unión a calcio y/o la hélice II del módulo sensor SCIII insertados en el módulo modulador de la Calbindina D_{9k} (las principales diferencias entre estos motivos consisten en el asa de unión a Ca^{2+} y en la disposición de los residuos cargados en la hélice II). Mediante un sistema reportero basado en la enzima pefenato deshidrogenasa (TyrA) de *E. coli.*, se pudo discriminar entre proteínas que presentan un comportamiento tipo sensor de las de tipo modulador. La fusión de módulos EF-hand a TyrA estabilizan el dímero de TyrA mostrando actividad enzimática, la cual, en el caso de las fusiones que poseen un EF-hand tipo sensor, es dependiente de Ca^{2+} . De acuerdo a este sistema reportero se determinó que las variantes construidas presentan un comportamiento tipo sensor.

En la presente tesis se determinaron las constantes de unión a calcio aparentes para cada una de las variantes mediante el seguimiento de la actividad del reportero a distintas concentraciones de calcio.

Una vez caracterizados los módulos individuales se realizó la reinsertión de los módulos EF-hand a la proteína Calbindina $\text{D}_{9k\text{-WT}}$, y se caracterizaron mediante dicroísmo circular y fluorescencia extrínseca. El comportamiento más interesante se observó en las variantes Clb $\text{D}_{9k\text{-SCIII}}$ y Clb $\text{D}_{9k\text{-HIClbnSCIII}}$ que mostraron un aumento en su estructura helicoidal en presencia de calcio, así como un cambio de fluorescencia dependiente de Ca^{2+} . Con los resultados obtenidos podemos concluir que tanto la reinsertión de un módulo sensor a la proteína moduladora Calbindina $\text{D}_{9k\text{WT}}$, así como el intercambio del asa de unión a calcio y la hélice II por los elementos correspondientes del módulo SCIII, son suficientes para conferir un comportamiento sensor en la Calbindina D_{9k} , demostrando que el asa de unión a calcio y la hélice 2, los cuales proveen los residuos de aminoácidos que forman el sitio de unión a calcio de un módulo sensor, son las unidades mínimas en las que radica este comportamiento.

INTRODUCCIÓN

El calcio (Ca^{2+}) es un metal alcalinotérreo importante para la vida ya que participa en procesos que van desde la mineralización hasta la señalización celular¹. Muchas proteínas se han adaptado para unir calcio a lo largo de un amplio intervalo de afinidades (nM a mM) debido a que la lectura de las señales intracelulares debe ser finamente regulada^{2,3}. La habilidad del calcio para alterar campos electrostáticos locales y la conformación de algunas proteínas que lo unen son las dos herramientas usadas para la transducción de señales².

En reposo, una célula excitable tiene concentraciones de Ca^{2+} de aproximadamente 100 nM, pero cuando se activa alcanza una concentración de unos 1000 nM. Las señales de calcio están reguladas por varias proteínas, la mayoría de las cuales pertenecen a la superfamilia de proteínas unidoras de Ca^{2+} altamente idénticas conocidas como EF-hand (EFCaBPs)^{4,5,6}. Estas proteínas se caracterizan por tener un motivo hélice-asa-hélice para la unión a calcio conocido como EF-hand. El término EF-hand fue creado por Kretsinger y Nockold en 1973⁷ para describir el motivo de unión a calcio encontrado en la parvalbúmina donde las hélices que formaban dicho motivo en esta proteína se nombraron como E y F (Fig. 1)^{4,5,8}.

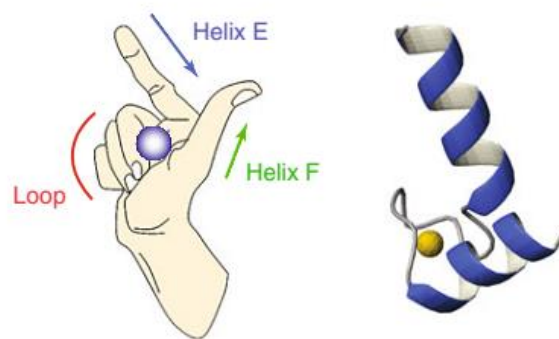


Figura 1. Motivo EF-hand Ca^{2+} ⁹. Se muestra la estructura de un motivo EF-hand unido a un ion Ca^{2+} y su analogía con una mano.

En la mayoría de los casos, los motivos EF-hand se encuentran como pares adyacentes formando un solo dominio globular, el cual es la unidad estructural y funcional básica de unión a Ca^{2+} Motivo EF-hand Ca^{2+} ^{9,10}. Las EFCaBPs se componen de uno o más de estos dominios globulares¹¹.

El motivo EF-hand es uno de los más comunes encontrados en los genomas animales y se encuentra ampliamente distribuido en toda la célula¹¹ con más de 600 dominios EF-hand identificados en el genoma humano¹². En eucariotas se han identificado unas 70 subfamilias que contienen de dos a doce EF-hand en tándem. En la mayoría de las proteínas estudiadas este motivo une calcio; sin embargo, existen algunas que unen magnesio^{13,14}. La mayoría de estas proteínas son citosólicas. Cada una de las subfamilias muestran movimientos particulares en respuesta a la unión del calcio¹⁵.

A pesar del enorme grado de identidad en secuencia encontrada en estas proteínas, la respuesta a la unión del calcio es diversa, dando lugar a una amplia gama de funciones en procesos biológicos que van desde reguladoras de la concentración de calcio en el citosol, transductores de señal entre compartimentos celulares, hasta funciones más complejas como la contracción muscular¹³. La diversidad de sus funciones es resultado en parte de los diferentes cambios estructurales que sufren cuando unen Ca^{2+} ⁶ así como un ajuste fino de sus propiedades de unión a Ca^{2+} para que coincida con sus papeles funcionales en la detección y modulación de las señales ^{3,16}.

Las proteínas unidoras de calcio EF-hand pueden ser divididas en dos clases funcionales: Sensoras de Ca^{2+} y moduladoras de Ca^{2+} , siendo el cambio conformacional inducido por la unión del calcio, la característica principal que las distingue (Fig. 2) ^{4,11}. Una comparación cuantitativa usando los ángulos entre las hélices de cada EF-hand cuando tienen unido o no el Ca^{2+} , muestra que las proteínas sensoras presentan cambios estructurales importantes en los ángulos inter-hélices (mayores a 60°). En contraste, las proteínas moduladoras como la Calbindina D_{9k} , muestran cambios conformacionales muy pequeños cuando une Ca^{2+} (ángulos menores a los 12°), de manera que la conformación libre de Ca^{2+} y la conformación de interacción son similares ¹⁷.

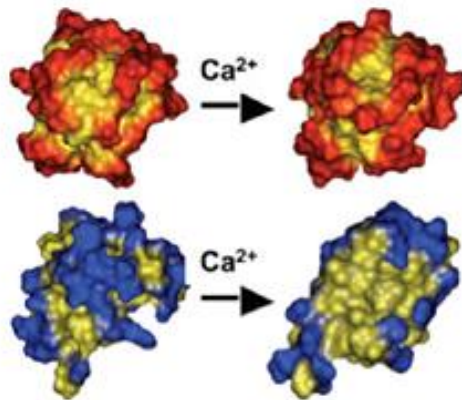


Figura 2. Diferencia en el cambio conformacional inducido por la unión del calcio en una proteína moduladora y una sensora. La proteína moduladora Calbindina D_{9k} se muestra en la parte superior y la proteína sensora Calmodulina en la parte inferior. El cambio conformacional inducido en la proteína sensora provoca un aumento en la superficie hidrofóbica accesible (en amarillo)¹¹.

Proteínas sensoras de Ca²⁺

La principal función de las proteínas sensoras es responder a una concentración de Ca²⁺ libre y activar la vía de señalización adecuada a través de un cambio conformacional producido por la unión del Ca²⁺ ^{6,16,18}. Este cambio conformacional provoca la exposición de superficies hidrofóbicas, lo cual les permite enlazarse a sus blancos, y transducir la señal^{4,6}. Así la transducción de la señal de calcio puede ser vista como un proceso de dos pasos que engloba una activación inicial de la proteína EF-hand por parte de la señal iónica, seguida por la unión a un blanco¹¹. Esta característica se ha aprovechado para caracterizarlas ya que el cambio conformacional les permite unirse a columnas hidrofóbicas¹⁷ por lo que es sencillo determinar experimentalmente cuando una proteína presenta esta propiedad. Caen dentro de esta clasificación de EFCaBPs las subfamilias de la calmodulina y el grupo de proteínas S100 las cuales responden a cambio espaciales y temporales en concentraciones de calcio en el intervalo de 0.1-10 μM¹⁹.

El análisis de los cambios conformacionales en las proteínas calmodulina y troponina C, indican que la unión de los iones Ca^{2+} genera el acercamiento de los sitios de unión a calcio del dominio causando un aumento en la distancia entre las hélices en el lado contrario del dominio, mientras las cadenas laterales hidrofóbicas en el centro de las hélices se mueven escasamente debido a impedimento estérico. Este movimiento provoca la exposición de zonas hidrofóbicas para la interacción (Fig. 2)²⁰.

A nivel molecular este cambio parece ser una consecuencia de la unión del Ca^{2+} por el asa, donde para formar completamente la esfera de coordinación del Ca^{2+} , el aminoácido número 12 que está demasiado lejos para unir al ión Ca^{2+} directamente, tiene que reposicionarse 2 Å aproximadamente junto con el resto de la hélice saliente de la que forma parte. Es este movimiento de la hélice lo que causa el cambio de conformación en el EF-hand. Con este movimiento la unión del ión Ca^{2+} es también estabilizada a través de la formación de nuevas interacciones entre las posiciones 2 y 9 del asa¹⁸.

La calmodulina es una proteína altamente conservada y se considera el arquetipo de las proteínas sensoras EF-hand. Está ampliamente distribuida en eucariotas e interacciona con numerosas proteínas de manera tanto dependiente de calcio como independiente de calcio. La unión del ión Ca^{2+} se da a través de un conector de 12 residuos que se denomina canónico⁶. La secuencia canónica del motivo EF-hand se encuentra también dentro de dominios de proteínas complejas como la miosina, así como en proteínas como la neurologina, la troponina C y la proteína oncogénica MDM2¹³.

Proteínas moduladoras de Ca^{2+}

Las proteínas moduladoras son un grupo pequeño de proteínas involucradas en la modulación de la señal y la homeostasis del calcio y muestran cambios conformacionales mínimos inducidos por la unión del ión Ca^{2+} , ya que sólo reorganizan algunas cadenas laterales^{6,14}. Por la naturaleza de su función, muestran afinidades más altas y velocidades de unión a Ca^{2+} más rápidas que las proteínas sensoras, por lo que son capaces de unirse a Ca^{2+} y regular la señal del mismo, antes de que alcance el umbral detectable por las sensoras de señal⁴.

Si bien estas dos clases de proteínas son claramente homólogas, aún no se ha logrado clarificar qué diferencias en la secuencia de los péptidos son las responsables de las diferentes funciones determinadas por su afinidad, cooperatividad y la respuesta a Ca^{2+} , ni cuál es el mecanismo que les permite una vez que unen calcio, distinguir entre diversos blancos celulares¹¹. Por lo que las EFCaBPs muestran una sorprendente capacidad de adquirir diferentes conformaciones en función del entorno (presencia o ausencia de iones de calcio unido y/o de proteínas diana). Además, dichas diferencias conformacionales son distintas entre las diferentes subfamilias, incluso bajo las mismas condiciones ambientales, lo cual refleja la variedad de funciones en las que estas proteínas están implicadas¹².

Estas características representan un reto para establecer una relación entre la secuencia, estructura y función en las EFCaBPs y con ello poder manipular estas proteínas a nivel celular con el fin de controlar las rutas de señalización como una herramienta importante tanto en aplicaciones terapéuticas como en biotecnología^{6,12}.

Uno de los aspectos importantes para la comprensión de esta relación es el estudio del papel que juega el asa de unión a calcio en la cooperatividad, la afinidad y la selectividad por los iones. Esta última característica toma relevancia debido a que el contenido de Mg^{2+} en la célula en reposo puede encontrarse en concentraciones cuatro órdenes de magnitud por arriba del nivel de calcio y estas proteínas tienen también la capacidad de unir este metal¹⁸.

Asas de unión a calcio

La mayoría de los EF-hand funcionales encontrados en las proteínas unen el calcio mediante un asa de 12 residuos aminoacídicos, la cual se considera el motivo canónico de unión a calcio⁵. En ambas clases funcionales, la mayor parte del asa de unión coordina el enlace mediante una configuración de bipirámide pentagonal, donde los seis residuos aminoacídicos involucrados en la unión se encuentran en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9 y 12 y son denominados como X, Y, Z, -Y, -X y -Z respectivamente (Fig. 3)²¹. Dos ligandos de calcio provienen además de un carboxilato bidentado suministrado por la cadena lateral de un aminoácido localizado en la hélice saliente, a tres residuos del extremo C del asa, comúnmente referido como el aminoácido número doce del asa. Además la esfera de

coordinación suele completarse por una molécula de agua unida a una de las cadenas laterales del asa. Varios de los residuos tienen roles individuales e identificables. El primer residuo del asa juega un papel importante para definir un arreglo electroquímico preciso. Una glicina conservada (56%) en la posición 6 facilita el establecimiento de un giro de 90° que permite a los ligandos de calcio restantes tomar las posiciones de coordinación. El octavo residuo del asa es un residuo hidrofóbico altamente conservado (Ile 68%). El patrón de puentes de hidrógenos formados por la cadena lateral del residuo en la posición nueve inicia la hélice saliente. Finalmente el ligando bidentado de la cadena lateral de la posición 12 es crítico, tanto para la estructura como para la función del asa¹⁸. Debido a estos papeles definidos, varios residuos encontrados en los conectores de unión a calcio de las proteínas EF-hand están altamente conservados y contribuyen a la estabilización y correcta formación del sitio de unión¹⁶. En las posiciones 1, 2 y 12 en asas de 12 residuos se encuentran favorecidos los aminoácidos ácido aspártico, glicina y ácido glutámico respectivamente²¹. Las asas EF-hand son ricas en aminoácidos cargados negativamente: ácido glutámico y ácido aspártico, siendo el residuo de ácido aspártico el más común y es el átomo de oxígeno el encargado de la coordinación con el Ca^{2+18} .

A



B

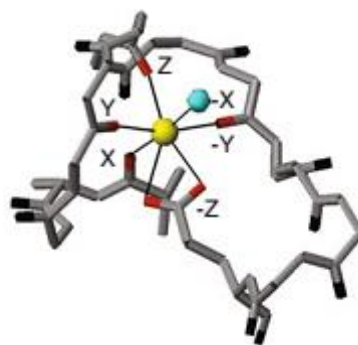


Figura 3. Interacción EF-hand- Ca^{2+} ⁹. A) Interacción de la proteína canónica calmodulina con Ca^{2+} (1EXR). B) Interacción de la proteína no canónica Calbindina D_{9k} con Ca^{2+} (3ICB).

Por otro lado, las asas no canónicas pueden ser clasificadas en varios grupos, los cuales demuestran diferentes maneras por las cuales se establece una conformación de bipirámide pentagonal. El primer grupo, aunque contiene la misma longitud de doce residuos no usa los ligandos canónicos para unir el ión Ca^{2+} . Un segundo grupo contiene un asa de once residuos y está presente en el motivo EF-hand 1 de la subfamilia de penta EF-hand. El tercer grupo son los que tienen inserciones; una subfamilia completa, la S100s y proteínas relacionadas incluyendo a la Calbindina D_{9k} , contienen asas no canónicas en el motivo EF-hand número 1 denominado “pseudo EF-hand” (ψ -hand). La unión del Ca^{2+} en este tipo de asa es principalmente por carboxilos de la cadena principal. Para alojar la inserción de dos residuos en la primera parte del asa, este segmento gira hacia afuera con los dipolos de los grupos carbonilos de la cadena principal que proporcionan los ligandos unidores +X, +Y y +Z. Interessantemente, la presencia de estos grupos ligandos inusuales no impide la formación de varios puentes de hidrógeno favorables, y al menos en el caso de la Calbindina D_{9k} , la alta afinidad por calcio se mantiene. La pérdida de coordinación por una de las cadenas laterales del asa, es compensada por la conformación alternativa del asa que permite al oxígeno de un grupo carbonilo de la cadena principal actuar como un ligando y mediante la coordinación de una molécula de agua adicional¹⁸.

Ciertas características se comparten entre todos los tipos de asas EF-hand, tales como que la unión del calcio es heptacoordinada con un arreglo de ligando en bipirámide pentagonal, reflejando las preferencia de ligación del ión Ca^{2+} sobre otros iones⁵.

Apareamiento EF-hand

Los motivos EF-hand se encuentran como pares adyacentes y la influencia entre ellos es importante. La cooperatividad de unión para los iones de calcio es una propiedad funcional esencial de la familia de proteínas EF-hand y es clave en las rutas de señalización de calcio³, ya que minimizan la concentración de Ca^{2+} requerida para alcanzar la saturación de las proteínas. Los EF-hand exhiben sensibilidades diversas al calcio reflejando la habilidad intrínseca de unión, así como el grado de cooperatividad en la unión del Ca^{2+} ¹⁸. La cooperatividad es especialmente importante en las proteínas sensoras debido a que les

provee la habilidad de funcionar como “on-off switches” respondiendo a cambios sutiles en la concentración de calcio¹¹.

Usualmente, el dominio globular funcional se forma a partir de una sola cadena polipeptídica, que presenta un conector entre los dos motivos⁴. Incluso se ha observado que péptidos aislados que representan un solo motivo EF-hand, en presencia de calcio, son capaces de adquirir la estructura hélice-asa-hélice desde un estado *random coil* y formar homodímeros aunque con una afinidad por Ca^{2+} varios órdenes de magnitud más baja que el EF-hand en la proteína completa. Por otro lado, se ha observado que al poner en solución péptidos, que de manera natural se encuentran apareados, da lugar a la formación preferencial de heterodímeros sobre homodímeros lo que indica una mayor afinidad en los heterodímeros. Así, estudios de cambios de aminoácidos en un EF-hand de una proteína, han mostrado que pueden tener efectos fuertes en la afinidad por Ca^{2+} de la EF-hand compañera^{22,23}.

En el apareamiento de un par de motivos EF-hand, las cuatro hélices anfipáticas se empaquetan perfectamente formando un núcleo hidrofóbico. Este empaquetamiento perfecto queda demostrado con la formación de heterodímeros desde módulos EF-hand individuales en presencia de Ca^{2+} reportados previamente. El plegamiento de 4 hélices permite cambios robustos en el empaquetamiento terciario sin que ocurran cambios significativos en la estructura secundaria; sin embargo, también puede oponer resistencia a cambios conformacionales como es el caso de la Calbindina D_{9k}²⁴.

Este apareamiento observado en los motivos EF-hand es estabilizado mediante un andamiaje β que abarca las posiciones 6 a 8 del asa, los cuales forman una bisagra, de manera que la rotación de unos pocos enlaces permite el cambio conformacional inducido por Ca^{2+} sin necesidad de un cambio conformacional mayor en los ángulos inter-hélices en algunas proteínas¹⁸. Dupuis y colaboradores⁸ encontraron que tal y como se ha reportado previamente¹, este andamiaje, además de ser crucial para la apertura del EF-hand por la unión a calcio, es también importante en el cierre, actuando así como un *switch* para los cambios conformacionales en las dos direcciones. La forma cerrada es estabilizada por la tendencia de consolidación/elongación de la hoja β junto con las atracciones hidrofóbicas entre las hélices, mientras que la conformación abierta es una consecuencia de la disrupción

de la hoja por la atracción de cadenas laterales oxigenadas hacia el calcio, que conduce a limitaciones espaciales (Figura 4)⁸. Incluso la diversidad de las conformaciones EF-hand ha sido atribuida a este andamio¹⁸.

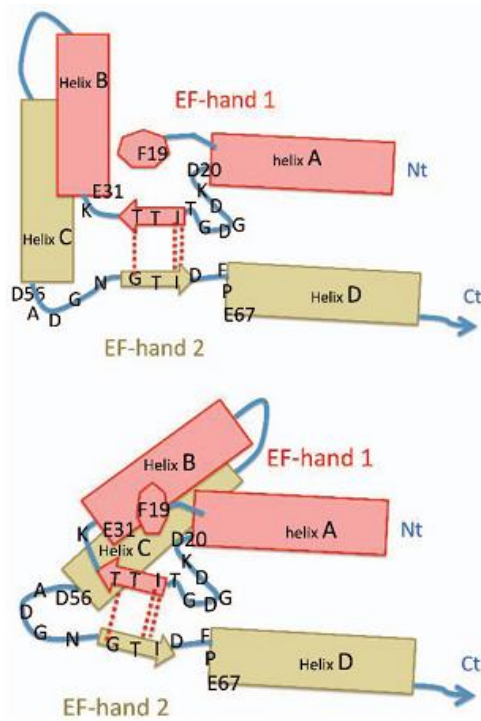


Figura 4. Transición holo (superior) y apo (inferior) del andamiaje β ⁸

preformación y estabilización estructural de los sitios de unión del Ca^{2+} y afectan además las propiedades de unión al ligando de una proteína, incluso en ausencia de contactos directos entre los residuos del núcleo y el ligando²⁵. Se ha observado que el intercambio de EF-hand entre proteínas modifica este empaquetamiento y con ello la interacción con sus blancos²⁶.

Otro mecanismo molecular de cooperatividad positiva implica contactos inter-hélices. Se ha propuesto que la fuerza de las interacciones inter-hélices es uno de los principales determinantes de la cooperatividad en las proteínas EF-hand¹⁸. Nara y colaboradores²⁷ reportan que la conformación de la región de la hélice α F es vital para la afinidad de unión a calcio de los motivos EF-hand.

Se ha encontrado en estudios realizados en la Calbindina $\text{D}_{9\text{k}}$, que la comunicación eficiente sitio-sitio es mediada por el empaquetamiento del núcleo hidrofóbico de ambos EF-hand, estos residuos se encuentran incluso distantes al sitio de unión a calcio. Sin embargo, no es posible aún identificar qué residuos en el núcleo hidrofóbico son los más importantes para la cooperatividad⁵. Las

interacciones del núcleo hidrofóbico son también importantes para la

En ambos mecanismos moleculares de cooperatividad positiva el ligando -Z (Glu12) juega un papel esencial. Glu12 sirve como un ligando en la coordinación de tipo bidentado que al interactuar con el Ca^{2+} conduce a cambios conformacionales que son transducidos al segundo EF-hand¹⁸.

A pesar de que la habilidad de los pares EF-hand a unir calcio mediante cooperatividad positiva es casi un dogma central en este campo, hay varios ejemplos de proteínas que contienen EF-hand que no parecen unir calcio de esta manera. Los sitios de unión en esas proteínas con unión no canónica pueden ser divididos en dos clases. La primera es definida como sitios secuenciales independientes, donde no se observa cooperatividad entre ellos, y la concentración de calcio a la cual llegan a estar ocupados es determinada por su afinidad intrínseca. La segunda clase de EF-hand son los sitios secuencialmente cooperativos donde la unión secuencial observada está estructuralmente ligada, y el orden de ocupación de los sitios es indistinto¹⁸.

Los efectos conformacionales de la cooperatividad son de dos tipos: estructurales y dinámicos. Los efectos dinámicos de la cooperatividad positiva son dominados por factores entrópicos. Los cambios en la flexibilidad de las asas EF y movimientos internos del núcleo del dominio conducen a cooperatividad positiva en la unión. A medida que la unión del primer ión de calcio paga tanto los costos estructurales de la reorganización como los costos entrópicos de la pérdida de flexibilidad dinámica interna, el segundo ión se une con mayor afinidad¹⁸.

Por último, se ha observado que variaciones en la organización de los dominios contribuyen de manera significativa a la selectividad por sus blancos¹⁹.

Afinidad

Entre los factores que gobiernan la afinidad hacia el calcio en las proteínas están el número y contribuciones de átomos de oxígeno de la cadena principal y/o de las cadenas laterales que directamente coordinan al metal, las superficies cargadas, los contactos que se establezcan entre el asa de unión a Ca^{2+} y las hélices, la preformación del sitio de unión en el estado libre de calcio, cambios conformacionales, así como las cadenas laterales que estabilizan moléculas de agua que coordinan al ión. La afinidad es también dependiente de

la posición exacta de los grupos coordinantes cargados y de la naturaleza de largo alcance de las fuerzas electrostáticas de residuos cargados a aproximadamente 15 Å^{25,28}.

Se ha observado que las moléculas de agua completan la esfera de coordinación del calcio de manera directa, o en algunos casos, los enlaces de hidrógeno que estas moléculas establecen con la cadena principal o cadenas laterales de la proteína pueden contribuir favorablemente a la afinidad por calcio. Un ión Ca²⁺ solvatado está regularmente coordinado por 6 a 8 moléculas de agua en su primera capa de hidratación. La liberación de estas moléculas de agua luego de la unión del Ca²⁺ en una proteína, provoca una contribución entrópica favorable. Mientras más moléculas de agua sean liberadas, mayor es la contribución. Sin embargo, para llevar a cabo una coordinación del ión Ca²⁺, se mantienen una o más moléculas de agua en la esfera de coordinación del calcio en la proteína. La conservación de una o más moléculas de agua podría facilitar la dinámica del ión. Mantener moléculas de agua en su esfera de coordinación puede ser una forma de modular la afinidad, impidiendo afinidades muy altas que en algunos casos pudieran ser inadecuadas²⁸.

Finalmente, la afinidad de un EF-hand por calcio puede ser afectada por la presencia o ausencia de interacciones intermoleculares. El incremento de la afinidad debido a interacciones intermoleculares puede deberse a tres consecuencias de la unión al blanco: Primero, la naturaleza anfipática de péptidos diana permite proteger las zonas hidrofóbicas expuestas que resultan de la unión al calcio en las proteínas sensoras como la CaM, ya que este fenómeno es entrópicamente favorable, así, el hecho de que un péptido cubra esta zona provoca un aumento en la afinidad. En segundo lugar, debido a las interacciones intermoleculares, hay una disminución en la tasa de disociación del calcio lo cual conduce a un aumento en la afinidad y finalmente debido a la estabilización del estado unido a calcio por la unión al blanco. Este fenómeno tiene importancia fisiológica debido a que en algunas proteínas la afinidad a calcio sólo es fisiológicamente relevante cuando el péptido está unido, aunque esta interacción puede también tener efectos negativos en otras proteínas de este tipo¹⁸.

Las bases moleculares que determinan un comportamiento sensor sobre un modulador y viceversa, especialmente aquellas responsables del cambio conformacional inducido por el

calcio han sido objeto de estudio durante mucho tiempo. Sin embargo, aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de estas proteínas, no se ha alcanzado un entendimiento completo de este proceso.

Uno de los enfoques usados para lograr este objetivo es la ingeniería de proteínas, que pretende diseñar cambios en la secuencia de proteínas modificadoras para conferirles un comportamiento sensor. Así como para definir las bases moleculares que confieren el comportamiento a cada grupo en presencia de Ca^{2+} . Dos de las proteínas más usadas en este ámbito, además de la calmodulina son la proteína modificadoras Calbindina D_{9k} y la proteína de tipo sensor Troponina C.

Calbindina D_{9k}

La Calbindina D_{9k} está involucrada en amortiguar el calcio intracelular y/o la absorción en la membrana del borde en cepillo intestinal y su internalización. La Calbindina D_{9k} puede ayudar a controlar la forma de la onda de señal inducida por calcio, tanto espacial como temporalmente, además de remover iones potencialmente dañinos del citoplasma. Sin embargo la relevancia de esta proteína en condiciones patológicas *in vivo* es incierta²⁹.

Calbindina D_{9k} es una proteína de aproximadamente 9 kDa, monomérica a pH fisiológico (7-7.5) y altamente estable²⁸. Consta de 75 residuos que se organizan en dos motivos EF-hand que se empaquetan formando un dominio globular (Figura 5). Las constantes de unión a calcio reportadas por Linse y colaboradores³⁰ son de $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y no sufre cambios estructurales evidentes al unir calcio. Se ha propuesto que el residuo Glu60 contribuye de manera importante a la afinidad de calcio

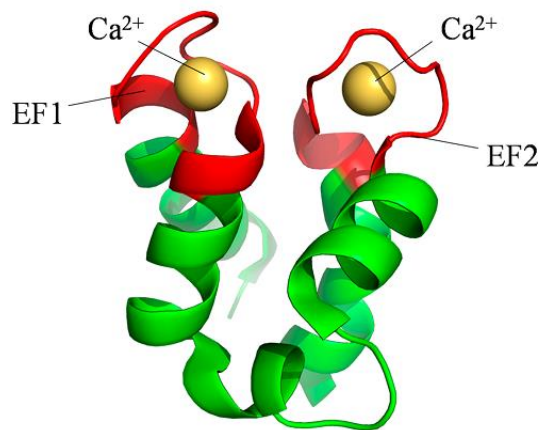


Figura 5. Calbindina D_{9k} ²⁹. Se muestra los dos motivos uniendo cada uno un ión de Ca^{2+} .

mediante la estabilización de una molécula de agua que participa en la esfera de coordinación²⁸. La unión a Ca^{2+} es un fenómeno cooperativo mediado por interacciones sitio-sitio altamente efectivas³. Sin embargo, se ha visto que la concentración de electrolito en la que se encuentra la proteína afecta la cooperatividad³¹. Un aspecto significativo para la alta afinidad mostrada por esta proteína, es la estabilización preferencial de la forma cargada de calcio por parte de los residuos del núcleo hidrofóbico²⁵.

Una característica importante de esta proteína es que contiene un EF-hand no canónico en la región N terminal, tal como sucede en las proteínas de la subfamilia S100 dentro de la que se ha agrupado. Esta asa no canónica es de 14 residuos y 4 de los 7 ligandos de unión a calcio son provistos por átomos de oxígeno de la cadena principal.⁶

La Calbindina D_{9k} no tiene puentes disulfuro y 27 de sus 75 residuos están cargados a pH neutro dando una carga neta de -7. Esto conduce a una repulsión carga-carga que desestabiliza la forma apo. No obstante, la proteína es mantiene su estructura, indicando la importancia de las interacciones entre residuos del núcleo hidrofóbico²⁴. Las estructuras de la Calbindina D_{9k} en las formas holo y apo, revelan una distribución de cargas asimétrica con una predominancia de cargas negativas en el sitio de unión a calcio y a su alrededor^{22,31}.

En esta proteína la respuesta conformacional de la unión a calcio es mínima y el proceso no conduce a la exposición de residuos hidrofóbicos²⁵. La hipótesis de la preformación del sitio de unión a calcio intenta explicar por qué la Calbindina D_{9k} no sufre un cambio conformacional al unir calcio y asume que es debido a que la posición de sólo un número limitado de cadenas laterales de ligandos a Ca^{2+} son diferentes en los estados apo y holo. La hipótesis de la preformación del sitio de unión implica que la proteína sensora Troponina C adopta la conformación abierta en el estado cargado por que la conformación cerrada es desestabilizada cuando une el calcio. Esta desestabilización no ocurre en la Calbindina D_{9k} , sin embargo, es posible que la Calbindina D_{9k} no ocupe la conformación abierta porque ésta es desestabilizada por problemas como el excesivo grado de exposición de residuos hidrofóbicos o a un conflicto de empaquetamiento del núcleo hidrofóbico. Estas propuestas no son mutuamente excluyentes⁶.

Algunos de los trabajos realizados con esta proteína con el fin de determinar qué residuos de aminoácidos controlan los cambios conformacionales inducidos por el calcio, así como la importancia de las interacciones que regulan su estructura y función se describen a continuación.

Julenius y colaboradores caracterizaron el efecto de cambios en los aminoácidos hidrofóbicos en la estructura y propiedades de plegamiento de la Calbindina D_{9k}. Sin embargo, encontraron que la desestabilización del núcleo hidrofóbico no es suficiente para inducir una afinidad hacia ANS dependiente de calcio tal y como se observa en las proteínas sensoras aunque sí para afectar su estabilidad y función. Demostraron también que la proteína puede tolerar grandes alteraciones que no se reflejan de manera drástica en la estabilidad y puede retener su plegamiento y respuesta conformacional a la unión a calcio²⁴.

Bunick y colaboradores diseñaron la calbinmodulina (CMB1), una Calbindina D_{9k} modificada que contiene 15 cambios para responder a la unión a calcio con un cambio conformacional similar al observado en la calmodulina. Dichos cambios se realizaron en la zona de interacción entre las hélices I y II para romper la preformación de la apo Calbindina D_{9k}. Si bien la variante CMB1 sufre apertura de las hélices, este movimiento no es equiparable al observado en la Calmodulina. Además la superficie hidrofóbica expuesta es también menor a la observada en CaM, lo cual se explica porque el conector entre los dos módulos EF-hand hace contactos significativos con el núcleo hidrofóbico en CMB1 pero no en CaM⁶.

Por otro lado. Johansson y colaboradores³² realizaron cambios puntuales en la Calbindina D_{9k} (JoMut) con el fin de alterar el plegamiento de este pseudo EF-hand hacia un plegamiento canónico, reteniendo además la afinidad a calcio. Los cambios en el EF-hand canónico consisten en el cambio de los aminoácidos A15D y P20G, y la eliminación de los residuos A14 y N21, esto debido a que consideran como características fundamentales para tener este comportamiento el tener un asa de 12 residuos y una glicina en la sexta posición y que la coordinación del ión Ca²⁺ cambie a ser coordinado principalmente por los carboxilatos de las cadenas laterales como en las asas canónicas. Si bien este grupo logró un cambio en la coordinación del Ca²⁺ hacia una coordinación principalmente por cadenas

laterales tal como sucede en un asa canónica, así como mantener la estructura de la proteína completa y que la constante de unión a calcio fuera tan alta como en el EF-hand canónico. Este cambio no indujo el cambio conformacional dependiente de Ca^{2+} en la proteína completa, de manera que el hecho de tener dos asas canónicas no es suficiente para tener cambios conformacionales dependientes de Ca^{2+} .

Troponina C

La Troponina C es la proteína de unión a calcio activa en el complejo Troponina y es la responsable de desencadenar contracciones musculares³²

La Troponina C (TnC) es una proteína de 18 kDa que posee un 66% de estructura de hélice α . Está formada por 4 motivos EF-hand organizados en dos dominios globulares (extremos N y C) unidos por un conector flexible de 31 residuos (Figura 6). El extremo C contiene los sitios con mayor afinidad a Ca^{2+}

III y IV ($K_{af} \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$) y se cree que están siempre ocupados, ya sea por calcio o magnesio ($K_{af} \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$). Los sitios I y II forman el extremo N y representan los sitios de baja afinidad ($K_{af} \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$) y regulan la contracción del músculo. Esta proteína presenta dos isoformas en músculo estriado, músculo esquelético (sTnC) y músculo cardiaco-esquelético (cTnC)

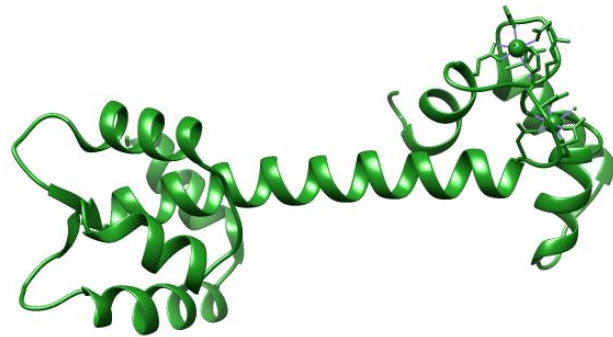


Figura 6. Troponina C. Representación en listones de la proteína Troponina C. Se muestra el ión Ca^{2+} y las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos que lo une en el dominio C-terminal (4TNC).

^{21,23,33}. Se ha observado que la posición 2 del asa de unión a Ca^{2+} en los EF-hand de mayor afinidad en varias Troponinas es un residuo básico (lisina o arginina) lo que sugiere que puede ser de importancia para la afinidad alta³⁴.

La unión de dos iones calcio en el extremo N de TnC induce un cambio conformacional que afecta la interacción de TnC con TnI que finalmente conduce a la contracción muscular. El análisis en el extremo N de la Troponina C muestra que no hay un cambio en la estructura secundaria luego de la unión al calcio, de manera que el incremento en la elipticidad negativa observada por dicroísmo circular no se debe a cambios en la estructura secundaria sino a cambios en la estructura terciaria³⁵.

El uso de péptidos sintéticos que equivalen a un motivo EF-hand ha sido empleado para estudiar las propiedades de unión a calcio de un sitio y compararlo ya sea con su par en el EF-hand o con un EF-hand de otras proteínas y determinar así posibles interacciones entre los sitios.

Un dominio altamente estudiado en esta proteína es el C terminal que va del residuo 90 al 162, el cual se compone de dos motivos EF-hand, uno va del residuo 93 al 126 (SCIII) y el otro lo forman los residuos del 129 al 162 (SCIV). El motivo SCIII está formado por dos α -hélices entre los residuos E95-D106 y E116-E123 y una hoja β corta que va de Y112 a D114 en presencia de calcio^{21,23,36}.



Figura 7. Dímero SCIII³³. Se muestra el homodímero de los módulos SCIII. Se representa las hélices como cilindros y los iones Ca^{2+} como esferas.

Con el fin de estudiar los efectos que las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas tienen en la estructura de la proteína, así como para comparar las propiedades de unión a calcio de un sitio con respecto a la proteína completa o su interacción con otros péptidos, Shaw y colaboradores sintetizaron un péptido de 34 residuos que representa el sitio de alta afinidad III de la Troponina C (SCIII). En este estudio encontraron que este péptido en ausencia de Ca^{2+} no se estructura de manera que aparece como *random coil* y en presencia de calcio adopta la estructura EF-hand, además de la formación de dímeros simétricos de estructura similar al encontrado en el extremo C de la Troponina C (Figura 7). En TnC, los residuos hidrofóbicos en la interface de la hélice N terminal del sitio III forman un clúster aromático

con residuos de la hélice C terminal del sitio IV. De manera similar, un núcleo alifático se forma entre las otras dos hélices de los sitios. En este apareamiento, las interacciones hidrofóbicas ocurren entre las cadenas laterales de F102 con F151 y F154 y de L98 con F154 para las hélices N-III y C-IV. En la interface C-III y N-IV, L118 y I115 interactúan principalmente con I134 y M138. Por otro lado, las interacciones hidrofóbicas encontradas en el dímero SCIII, son establecidas por los residuos de la hélice N terminal L98, A99, A101, F102 de un motivo, con los residuos I115, L118, G119, L122 de la hélice C terminal de otro²³. Se propone que el mecanismo para la dimerización de SCIII consiste en que la unión del calcio de un péptido SCIII induce su estructuración a una hélice-asa-hélice. Este péptido se une a una molécula apo-SCIII provocando que se estructure y formando así el dímero que luego une el segundo calcio. Las constantes de disociación encontradas en el péptido aislado SCIII son de 3 μM y 1mM, comparado con 20 nM en un fragmento que contiene ambos sitios III y IV^{21,37-39}. Además, se ha observado que péptidos con la hélice N terminal más corta, muestran afinidades significativamente más bajas, debido a que la hélice N terminal es la región inducible por el Ca^{2+} , siendo la hélice N terminal, la que realiza una importante contribución en la estabilización de unión a Ca^{2+} .⁴⁰

Osuna y colaboradores⁴¹ estudiaron los motivos EF-hand N terminal de la Calbindina D_{9k} y SCIII de Troponina C y lograron conferir al dominio modulador un comportamiento sensor mediante el intercambio de elementos de estructura secundaria completos (elementos helicoidales y el asa). El comportamiento sensor adquirido por el motivo modulador fue determinado sólo mediante un sistema reportero que discrimina módulos EF-hand sensores de moduladores; sin embargo, falta evaluar si éstas variantes son capaces de alterar la conformación de la proteína completa cuando son reinsertados a ésta.

ANTECEDENTES

Osuna y colaboradores⁴¹, estudiaron el efecto de los elementos helicoidales en el cambio conformacional de los motivos EF-hand de la proteína tipo sensor Troponina C y en el N terminal de la proteína moduladora Calbindina D_{9k}.

Para estudiar el efecto de los elementos estructurales secundarios en las diferentes respuestas a calcio de ambas proteínas, se realizó inicialmente un análisis de las secuencias de un motivo EF-hand de cada una de las proteínas: El motivo SCIII de Troponina C (EF-hand canónico) y el motivo N terminal de la Calbindina D_{9k} (ClbN). Las hélices de estos módulos guardan aproximadamente un 40% de identidad y un 60% de similitud en sus secuencias. Las principales diferencias entre los motivos EF-hand SCIII y ClbN consisten en el asa de unión a Ca²⁺ y en la disposición de los residuos cargados en la hélice C terminal. Así, se construyeron motivos EF-hand quiméricos que contienen la hélice II y/o el asa de unión a calcio del módulo sensor SCIII insertados en el módulo modulador de la Calbindina D_{9k}. La figura 8

muestra la secuencia de los dos módulos analizados así como las quimeras resultantes. Los aminoácidos subrayados en el asa SCIII representan los residuos de aminoácidos que se desvían del consenso. Los residuos

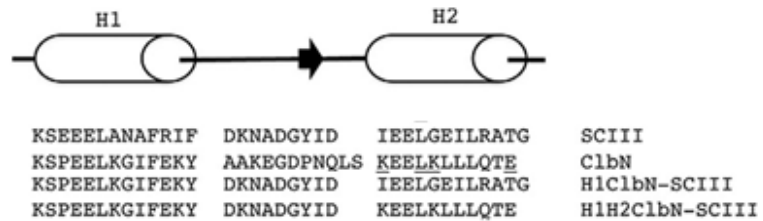


Figura 8. Secuencia de aminoácidos de los motivos SCIII, ClbN y motivos quiméricos⁴¹.

marcados en ClbN indican los residuos cargados diferenciales con SCIII⁴¹.

Las proteínas quimeras fueron analizadas mediante el sistema reportero desarrollado por Osuna y colaboradores⁴¹ que permite discriminar entre un motivo EF-hand sensor y modulador, mediante cambios en la actividad del reportero en presencia de calcio. Este sistema reportero consiste en la fusión de la enzima pefenato deshidrogenasa de *E. coli* (TyrA) al módulo EF-hand y se basa en el hecho de que los módulos EF-hand individuales tienen la capacidad de formar homodímeros estables en solución³⁴.

Por otro lado, el dominio prefenato deshidrogenasa (TyrA) de *E. coli* es parte de una proteína bifuncional (Proteína T) que se encuentra fusionada a la corismato mutasa. Para su función necesita formar un homodímero; sin embargo, por sí sola TyrA no dimeriza, sino que depende de la corismato mutasa. La propiedad de homodimerización de los motivos EF-hand permite estabilizar a TyrA cuando se construye una proteína de fusión en la que se reemplaza el gen de la corismato mutasa por un módulo de EF-hand produciendo así una enzima homodimérica activa. Esto demuestra que en el contexto de la proteína de fusión, es posible la formación de

dímeros aún en ausencia de Ca^{2+} a diferencia de los reportes previos donde se analizan péptidos individuales, los cuales necesitan de Ca^{2+} para adquirir su estructura y con ello formar dímeros. Además, se encontró que el Ca^{2+} puede regular la actividad de TyrA en las construcciones

generadas (Figura 9)⁴¹.

Los resultados en el contexto de la proteína

de fusión indicaron que la sustitución de 14 residuos del conector que une Ca^{2+} del motivo modulador con el conector de 12 residuos del motivo sensor EF-hand SCIII es suficiente para generar un cambio en la actividad del reportero, lo que sugiere un cambio conformacional dependiente de Ca^{2+} ⁴¹. Sin embargo, la demostración de dicho cambio no está completamente elucidado y es uno de los objetivos del presente trabajo.

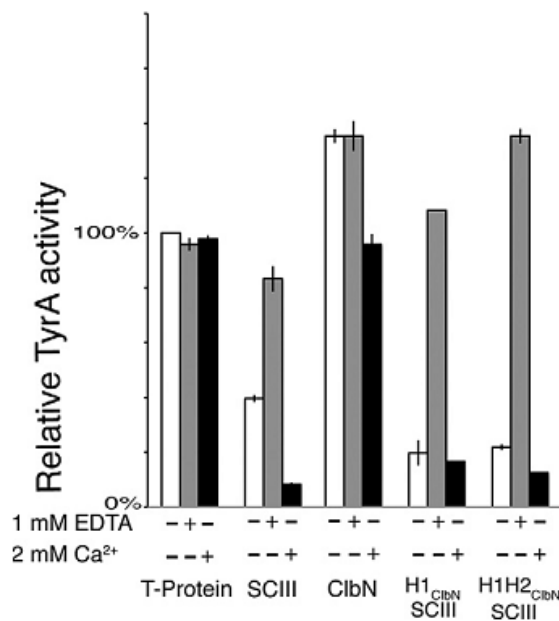


Figura 9. Comparación en la actividad de TyrA en las proteínas de fusión y la proteína T. Las barras blancas representa la actividad observada en ausencia de EDTA y Ca, las barras en color gris representan a la proteína en presencia de 1 mM de EDTA y las barras en color negro en presencia de 2 mM de Ca^{2+} ⁴¹.

En el presente proyecto se busca caracterizar si dichas construcciones modifican el comportamiento de la proteína Calbindina D_{9k} completa cuando son reintegradas a ésta. Por otro lado, construimos el diseño reportado por Johansson y colaboradores, que aparentemente no es capaz de inducir el cambio conformacional una vez integrado a la proteína completa y fusionarlo a TyrA como parte de la validación de nuestro sistema reportero.

HIPÓTESIS

La sustitución del asa de unión a calcio o es asa de unión a calcio y la hélice II por los equivalentes del motivo sensor SCIII en la proteína Calbindina D_{9k}, es suficiente para conferir un cambio conformacional dependiente de Ca²⁺ en la proteína completa.

OBJETIVOS GENERALES

Analizar el cambio conformacional de los motivos EF-hand mediante técnicas espectroscópicas que complementen el análisis mediante el sistema reportero EF-hand-TyrA.

Analizar el cambio conformacional de la Calbindina D_{9k}, en respuesta a la unión de Ca²⁺ cuando el motivo N-terminal es remplazado por los motivos quiméricos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar el cambio conformacional del EF-hand en el contexto de fusión a TyrA en respuesta a la unión a Ca²⁺, usando técnicas de dicroísmo circular (CD), fluorescencia y el seguimiento de la actividad enzimática del reportero.
- 2) Construir el diseño JoMut³² fusionado a TyrA para determinar su comportamiento en nuestro sistema reportero.
- 3) Reintegrar los motivos EF-hand analizados a la molécula de Calbindina D_{9k}, y determinar mediante técnicas de CD y fluorescencia si existe un cambio conformacional en la proteína completa y compararlos con la Calbindina D_{9k} WT.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental para llevar a cabo los objetivos se dividió en dos partes:

PARTE 1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LOS MOTIVOS INDIVIDUALES H1CLBNSCIII, H1H2CLBNSCIII Y DEL DISEÑO REPORTADO POR JOHANSSON Y COLABORADORES (JOMUT) EN EL CONTEXTO DEL SISTEMA REPORTERO (TYRA)

1.-Obtención de los genes codificantes para las variantes H1_{ClbN}SCIII, H1H2_{ClbN}SCIII, JoMut, y los motivos ClbN y SCIII fusionados al reportero (TyrA)

Se contaban al inicio de este proyecto con los genes de tres de las 5 proteínas a analizar: SCIII-TyrA, ClbN-TyrA y H1H2_{ClbN}SCIII-TyrA. Estos genes fueron construidos previamente por el Dr. Joel Osuna⁴¹.

Para construir los genes codificantes para las proteínas de fusión H1_{ClbN}SCIII-TyrA y JoMut-TyrA se llevó a cabo lo siguiente:

Construcción del gen que codifica H1_{ClbN}SCIII-TyrA.

Para la construcción de este gen se utilizó como plantilla el plásmido que contiene el gen codificante para la proteína de fusión SCIII-TyrA y se diseñaron los oligonucleótidos de la Tabla 1, los cuales se sintetizaron en la Unidad de síntesis del IBt/UNAM.

Se realizaron 2 PCRs para la construcción de la secuencia que codifica para el motivo H1_{ClbN}SCIII-TyrA. En la primera se añadió al gen *scIII*, el fragmento que codifica para la hélice 1 del módulo ClbN mediante el oligonucleótido H1ClbNtoSCIIIFor (*forward*) y el oligonucleótido Back (*reverse*). Posteriormente el producto obtenido se utilizó como plantilla para un segundo proceso de PCR donde los oligonucleótidos utilizados fueron ClbNNcoIH6For (*forward*) y Back (*reverse*). El oligonucleótido ClbNNcoIH6for añade un sitio NcoI en el extremo 5' para la clonación en el vector y una secuencia que codifica para una etiqueta de 6 histidinas para fines de purificación. El oligonucleótido Back hibrida en una zona de *tyrA*.

Oligonucleótido	Secuencia
H1ClbNtoSCIIIFor	5' AAA AGC CCC GAA GAG CTG AAA GGG ATC TTC GAA AAA TAC GAC AAA AAC GCG GAC GGG 3'
ClbNNcoIH6For	5' CGG CGG CCA TGG CCC ACC ATC ACC ATC ACC ATA AAA GCC CCG AAG AGC TG 3'
Back	5' CAG TCA TGT TGC TCC AGA AT 3'

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la construcción del gen que codifica para la variante H1_{ClbN}SCIII-TyrA.

Construcción del gen codificante para JoMut.

Para dicha construcción se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 2:

Oligonucleótido	Secuencia
JoFor	5' GAA AGG GAT CTT CGA AAA ATA CGA CAA AGA AGG TGA CGG GCA GCT CTC CAA AGA AGA G 3'
ClbNNcoIH6For	5' CGG CGG CCA TGG CCC ACC ATC ACC ATC ACC ATA AAA GCC CCG AAG AGC TG 3'
Back	5' CAG TCA TGT TGC TCC AGA AT 3'

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la construcción del gen que codifica para la variante JoMut.

Para la primer PCR se usó como plantilla el plásmido que contiene la construcción génica de la proteína de fusión ClbN-TyrA, así como los oligonucleótidos JoFor (*forward*) y Back (*reverse*). En la segunda PCR se utilizó nuevamente dicho plásmido como templado, pero se amplificó usando el oligonucleótido ClbNNcoIH6For como *forward* y como *reverse* el

producto obtenido de la PCR anterior. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 100 μ l como se describe en el anexo 1.1.

Los fragmentos obtenidos en ambos casos poseen un sitio de restricción NcoI y la secuencia codificante para 6 histidinas (His6-tag) en el extremo 5' y el sitio de restricción PstI en el extremo 3'.

Estas construcciones se purificaron a partir de un gel de agarosa al 1% de acuerdo a lo recomendado en el instructivo del kit de Roche "High PCR purification isolation" y se corroboró la purificación mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos fueron digeridos con las enzimas correspondientes y ligados en el vector denominado "pseudoproteína T silvestre" construido por Osuna y colaboradores⁴² a partir del vector de expresión pTrc99A que posee un promotor *trp* regulado por el represor LacI y resistencia a ampicilina. Este vector contiene el gen *tyrA* clonado mediante su extremo 3' mientras que el extremo 5' cuenta con un sitio PstI libre. El gen construido se clonó entre el sitio NcoI presente en el sitio de clonación múltiple del vector pTrc99A y el sitio PstI localizado en el extremo 5' de *tyrA*. Las reacciones de digestión y ligación se muestran en el anexo 1.2.

Transformación de la cepa MC1061 de E. coli

El producto de las ligaciones se utilizó para transformar por electroporación células electrocompetentes de la cepa MC1061 de *E. coli*, para la obtención de las construcciones. Se plaquearon 200 μ L de las células electroporadas en cajas con medio de cultivo LB (Lysogeny broth) suplementado con Ampicilina a una concentración de 200 μ g/mL (LB-Amp) (Anexo 2.1). Se incubaron a 30 °C durante 12 horas para su crecimiento. La ampicilina permite seleccionar a las células que fueron transformadas por el plásmido.

Una colonia de las obtenidas de cada construcción se utilizó para inocular 5 mL de LB-Amp líquido y se dejaron crecer durante 10 horas a 30 °C con agitación a 250 rpm. Transcurrido dicho periodo, se purificaron los plásmidos utilizando el "High pure plasmid isolation kit" de Roche y se corroboró por digestión con las enzimas NcoI y PstI la presencia del fragmento. Finalmente los plásmidos obtenidos se secuenciaron en la Unidad

de síntesis del IBt/UNAM para asegurar que las construcciones fueran correctas para lo cual se usó el oligonucleótido mostrado en la tabla 3.

Oligonucleótido	Secuencia
99Nco	5' GCG CCG ACA TCA TAA CGG TTC TGG C 3'

Tabla 3. Secuencia del oligonucleótido usado para la secuenciación de los plásmidos.

Sobreexpresión de las proteínas de fusión para purificación

Las proteínas se sobreexpresaron en la cepa FA114 de *E. coli* que carece del gen cromosomal que codifica para la proteína T, evitando así la actividad silvestre de esta proteína. La cepa contiene el gen de resistencia a Kanamicina por lo cual, los medios utilizados fueron suplementados con este antibiótico de manera que se asegurara la presencia de nuestra cepa y se evitara la contaminación con otros organismos. Para la sobreexpresión se siguió el procedimiento descrito en el anexo 3.1.

Purificación de las proteínas

- I. Las células se resuspendieron en 10 ml de buffer de unión y se lisaron en un Sonicador Branson 450 dando seis pulsos de 50 % de intensidad por 30 s, manteniendo la muestra en un baño de hielo. La muestra se dejó enfriar 120 s entre cada pulso.
- II. Se centrifugó el lisado a 12 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos.
- III. Las variantes fueron purificadas utilizando cromatografía de afinidad para lo cual la fracción soluble se hizo pasar por una columna con 3 mL de níquel-agarosa.

Las columnas se lavaron con agua grado milliQ y se cargaron con níquel mediante una solución 50 mM de NiSO₄. Posteriormente las columnas se equilibraron con 30 mL de buffer de unión (5 mM imidazol 0.5 M NaCl 0.5 M TRIS pH 7.5). Los extractos celulares que contienen las proteínas se cargaron en la columna y se

lavaron con 18 mL de buffer de lavado (35 mM imidazol 0.5 M NaCl 0.5 M TRIS pH 7.5).

IV. Las proteínas unidas a la columna por la cola de His6 se eluyeron con 2 mL de buffer de elución que contenía 300 mM de imidazol.

La pureza y calidad de las proteínas de fusión EF-hand-TyrA se confirmó mediante una electroforesis SDS-PAGE al 10 % y se determinó la concentración de cada una de las variantes por el método de Bradford.

Ensayos de actividad enzimática

Se realizaron ensayos de la actividad para la proteína reportera TyrA mediante la medición de la aparición de NADH a 340 nm, tal como se describe en Osuna y colaboradores⁴².

Se determinó mediante este ensayo que en los módulos individuales de *EF-hand* tipo sensor fusionados a la proteína TyrA, presentan un comportamiento tipo *switch* para la actividad de TyrA en presencia/ausencia de calcio mientras que en los motivos de las proteínas tipo modulador fusionados a TyrA el cambio es mínimo.

Para el análisis de las proteínas de fusión se determinó la concentración para cada una de las proteínas mediante el método de Bradford.

Los ensayos de la actividad enzimática se realizaron con una cantidad de enzima pura de 2 µg por reacción. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en una placa de 96 pozos en un volumen de 150 µL. La mezcla de reacción contiene la enzima purificada, 2 mM de NAD⁺, 1 mM de DTT. La reacción se inició añadiendo ácido pifénico (PPA) a una concentración final de 0.2 mM, que es suficiente para asegurar condiciones de saturación. El amortiguador usado para la reacción consiste en 50 mM de TRIS pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA. Para determinar el comportamiento del reportero en ausencia y presencia de calcio, se añadió calcio a una concentración final de 2 mM, mientras en las que se deseaba analizar al módulo libre de calcio se agregó EDTA a una concentración final de 1 mM.

Se realizó también un análisis de la actividad enzimática a varias concentraciones de calcio. Dichas concentraciones se muestran en la parte de resultados y se llevó a cabo tal como se describió para el análisis de actividad enzimática en presencia de 2 mM de Ca²⁺. Las

proteínas de fusión fueron previamente dializadas con EDTA para remover el calcio presente en las proteínas. El proceso de diálisis se describe en el anexo 3.2.

Todas las pruebas de actividad enzimática se realizaron por triplicado y se monitoreron a una longitud de onda de 340 nm, usando un lector de placa Safire controlada por la plataforma TECAN (Tecan Group LTD, Männedorf, Suiza).

Determinación del grado de oligomerización de las proteínas EF-hand-TyrA

Las proteínas purificadas se analizaron mediante cromatografía de exclusión molecular para determinar su estado de oligomerización. Se determinó el estado oligomérico en las tres condiciones en las que se evaluó la actividad enzimática del reportero: Posterior al proceso de purificación, en presencia de calcio y en ausencia de calcio (EDTA).

Para dicho fin se utilizó una columna Beckman Ultraspherogel SEC 3000 acoplada a un equipo HPLC system Gold Beckman. La detección se realizó con un detector UV a 280 nm. Se inyectaron aproximadamente 50 µg de cada proteína y se corrió con un amortiguador TRIS 20 mM, NaCl 20 mM pH 7.5 a una velocidad de flujo de 0.7 ml/min. Dicho amortiguador, en el caso del análisis en presencia de calcio, presentaba una concentración de 2 mM y en el caso del análisis en ausencia, se incluyó EDTA a una concentración 1 mM. La masa molecular aparente se determinó por comparación con el perfil de elución de un estándar de filtración en gel de Bio-Rad (1.352-670 KDa).

Análisis de los cambios conformacionales en las proteínas de fusión mediante dicroísmo circular

Para determinar posibles cambios en la estructura secundaria, tanto del módulo EF-hand como de TyrA, se llevó a cabo un análisis por dicroísmo circular. La proteína sensora tipo EF-hand (TnC) que se usó en este estudio no sufre un cambio en la proporción de hélices α como sucede en otras proteínas sensoras como la calmodulina, sin embargo, es necesario evaluar que no se esté sufriendo un cambio estructural subyacente debido a los cambios generados.

Los espectros de dicroísmo circular (CD por sus siglas en inglés) se registraron con un espectropolarímetro marca Jasco Modelo 715 (Analytical instruments), usando una celda de 0.1-cm de longitud de paso óptico y midiendo en el intervalo de 190 a 260 nm. La temperatura se reguló mediante un contenedor de celda con temperatura-controlada por un Peltier (modelo PTC-4235, Jasco). Los espectros de CD se registraron cada 1 nm con un tiempo de promedio de la señal de 8 s por punto y con un ancho de banda de 1 nm. Para cada muestra se promediaron tres espectros para aumentar la relación señal /ruido.

Análisis de exposición de zonas hidrofóbicas mediante la interacción de las proteínas con ANS

El ANS (Ácido 8-Anilino-naftaleno-1-Sulfónico) es una sonda fluorescente de transferencia de carga que en soluciones acuosas esencialmente no fluoresce, pero en ambientes hidrofóbicos incrementa su fluorescencia fuertemente o cuando el movimiento rotacional del grupo fenilamino está restringido, tal es el caso cuando se encuentra en solventes no polares o cuando se une a regiones hidrofóbicas de proteínas o membranas. Se sabe que el rendimiento cuántico de ANS es de 0.002 en soluciones acuosas, pero es cercano a 0.4 cuando se une a BSA. Este aumento drástico en el rendimiento cuántico permite que la sonda en su estado libre no interfiera con las propiedades espectrales de la fracción unida. Además, la longitud de onda máxima de fluorescencia del ANS muestra un desplazamiento hacia el azul en solventes poco polares relativo a un solvente altamente polar como el agua. Por estas características el ANS puede revelar la polaridad de sus entornos y por ello ha sido usado en estudios como pruebas de hidrofobicidad en proteínas^{43,44}.

Las proteínas de fusión analizadas fueron las variantes ClbN-TyrA y SCIII-TyrA las cuales corresponden a los módulos EF-hand parentales, esto con el fin de determinar si existe un comportamiento diferencial entre el módulo sensor y el modulador en el contexto de la proteína de fusión. Las proteínas se dializaron para eliminar el calcio previamente. Para este análisis se usó una solución 2 μM de proteína dializada y 40 μM de ANS. Para el análisis en presencia de calcio se añadió calcio a una concentración final de 1 mM. Para la preparación de las muestras se utilizó agua grado milliQ. Las proteínas se encontraban en un

amortiguador 10 mM TRIS-HCl pH 7.5, 10 mM de NaCl. Se midió el espectro de emisión de 400 a 700 nm a 20 °C usando 380 nm como longitud de onda de excitación para el ANS.

PARTE 2. REINSERCIÓN DE LOS MÓDULOS CONSTRUIDOS A LA PROTEÍNA CALBINDINA D_{9k} Y SU ANÁLISIS

Obtención de los genes codificantes para las proteínas Calbindina D_{9k} reinsertando los motivos construidos

Para la construcción de cada uno de los genes que codifican para las proteínas Calbindina D_{9k} quimeras que contienen los módulos diseñados previamente, se utilizaron los oligonucleótidos que se enlistan en la tabla 4, los cuales se sintetizaron en la Unidad de síntesis del IBt/UNAM.

Oligonucleótido	Secuencia
For1EFhand2ClbN	5' CCA AGC ACC CTC GAT GAG CTT TTT GAA GAA TTA GAC AAG AAT GGA GAT GGC GAA GTT AGC TTC GAA G 3'
ForSCIII	5' CGG CGG CCA TGG CCC ACC ATC ACC ATC ACC ATA AAA GCG AAG AGG AAC TG 3'
Back1EFhand2Clb	5' GCC GCC AAG CTT TTA TTA CTG GGA GAT CTT TTT CAC CAA CAC CTG GAA TTC TTC GAA GCT AAC TTC GCC A 3'
Back2InterClbN	5' CAT CGA GGG TGC TTG GAC CCT TCA GCA AGC TGG GGA ACT CGG TCT GGA GGA GCA GT 3'
Back2InterSCIII	5' CAT CGA GGG TGC TTG GAC CCT TCA GCA AGC TGG GGA ACC CGG TCG CGC GGA GGA T 3'
Calb1NcoH6Forw	5'CGG CGG CCA TGG CCC ACC ATC ACC ATC ACC ATA AAA GCC CCG AAG AGC TG 3'

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la construcción de las proteínas Calbindina D_{9k} WT y las variantes

Para cada construcción se realizaron 3 reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos indicados en la tabla 4 como se describe en el anexo 1.3.

Los fragmentos obtenidos se analizaron siguiendo los métodos descritos en la primera parte, la obtención de los plásmidos con las construcciones se llevó a cabo en la cepa MC1061 de *E. coli* como se ha descrito previamente.

Sobreexpresión y purificación de las proteínas

Las proteínas se sobreexpresaron en la cepa FA114 de *E. coli* siguiendo la metodología descrita para la sobreexpresión de las proteínas de fusión y la purificación se realizó como se describe a continuación:

I. Las células se resuspendieron en 10 mL de buffer de unión y se lisaron con un sonicador Branson 450 dando seis pulsos de 50 % de 30 s, manteniendo la muestra en un baño de hielo. La muestra se dejó enfriar 120 s entre cada pulso.

II. Se centrifugó el lisado a 12 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos.

III. Las variantes fueron purificadas utilizando cromatografía de afinidad para lo cual la fracción soluble se hizo pasar por una columna con 3 mL de níquel-agarosa.

El extracto celular fue cargado sobre columnas previamente lavadas con agua grado milliQ y cargadas con níquel con una solución 50 mM de NiSO₄ y equilibradas con 30 ml de buffer unión (5 mM imidazol 0.5 M NaCl 0.5 M TRIS pH 7.5).

La columna fue lavada con 18 mL de buffer de lavado (35mM imidazol 0.5 M NaCl 0.5 M TRIS pH 7.5).

IV. Para la elución de las proteínas unidas a la columna por la cola de His₆ se utilizó un volumen de columna de una solución de imidazol 70 mM.

Posteriormente, las proteínas fueron dializadas con el fin de remover tanto el calcio unido a las proteínas, como el imidazol del proceso de purificación. Finalmente la pureza de las proteínas se corroboró a través de un gel SDS-PAGE al 10% y se determinó la concentración de cada proteína mediante el método de Bradford.

Análisis de cambios en estructura secundaria en respuesta a calcio mediante dicroísmo circular de las proteínas Calbindina D_{9k} WT y quimeras

Debido a que una característica distintiva de las proteínas sensoras de calcio es que luego de la unión del metal se inducen cambios en su estructura secundaria, se analizó el comportamiento de las variantes construidas mediante dicroísmo circular en presencia y ausencia de calcio.

Los espectros de dicroísmo circular se realizaron usando una celda de 0.1-cm de longitud de paso óptico con 300 μ l de muestra a una concentración 0.2 mg/ml. Para el análisis en presencia de calcio se usó una concentración de 1 mM de CaCl₂. Al igual que los análisis de las proteínas de fusión se utilizó un espectropolarímetro marca Jasco Modelo 715 (Analytical instruments), midiendo en el intervalo de 190 a 260 nm. La temperatura se reguló mediante una contenedor de celda con temperatura controlada por un Peltier (modelo PTC-4235, Jasco). Los espectros de CD se registraron cada 1 nm con un tiempo promedio de la señal de 8 s por punto y con un ancho de banda de 1 nm. Para cada muestra se promediaron tres espectros para aumentar la relación señal/ ruido.

Análisis de fluorescencia extrínseca de las proteínas en respuesta a calcio

Para determinar la exposición de regiones hidrofóbicas en respuesta a la unión a calcio se realizó un análisis de fluorescencia extrínseca mediante la interacción con ANS siguiendo las condiciones que se describieron previamente.

Para este análisis se utilizaron 400 μ L de muestra a una concentración de 0.2 mg/ml. El análisis en presencia de calcio se realizó usando varias concentraciones de calcio para las proteínas en las que se ha observado un comportamiento tipo sensor, mientras que para las del tipo modulador se realizó en ausencia y en presencia de 1 mM de calcio. La muestra fue excitada a 380 nm de longitud de onda y se colectó la emisión de fluorescencia mediante un barrido de 400 a 700 nm a una velocidad de 100 nm/min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE 1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LOS MÓDULOS INDIVIDUALES $H1_{C1bN}SCIII$, $H1H2_{C1bN}SCIII$, JOMUT, Y LOS MOTIVOS $C1bN$ Y $SCIII$ EN EL CONTEXTO DEL SISTEMA REPORTERO

Genes codificantes para las variantes $H1_{C1bN}SCIII$, $H1H2_{C1bN}SCIII$, JoMut, y los motivos WT $C1bN$ y $SCIII$ fusionados a TyrA

Se obtuvieron los plásmidos con las 5 construcciones deseadas: $C1bN$ -TyrA, $SCIII$ -TyrA, $H1_{C1bN}SCIII$ -TyrA, $H1H2_{C1bN}SCIII$ -TyrA y JoMut-TyrA. Estos plásmidos contienen el gen del motivo EF-hand unido mediante su extremo 3' al extremo 5' del gen *tyrA* en el plásmido pTrc99A.

Esta construcción génica codifica para las proteínas de fusión EF-hand-TyrA unidas mediante el extremo C de las EF-hand al N terminal de la proteína TyrA y tienen un peso aproximado de 35 kDa. A continuación se muestran de manera general las características de los EF-hand fusionados y se muestra un esquema en la figura 10.

$C1bN$: Representa un módulo EF-hand modulador individual proveniente de la proteína Calbindina D_{9k} bovina.

$SCIII$: Es un módulo EH-hand tipo canónico de Troponina C por lo que sufre un cambio conformacional significativo al unir calcio.

$H1_{C1bN}SCIII$: Esta mutante posee la hélice 1 de Calbindina D_{9k} y el asa de unión a calcio y la hélice 2 de la Troponina C.

$H1H2_{C1bN}SCIII$: Este módulo posee ambas hélices provenientes de la Calbindina D_{9k} y solo el asa de unión a calcio de la Troponina C.

JoMut: En esta mutante reportada por Johansson y colaboradores³² fueron eliminados los residuos A14 y N21, mientras que otros dos residuos del asa fueron sustituidos: A15D y P20G.

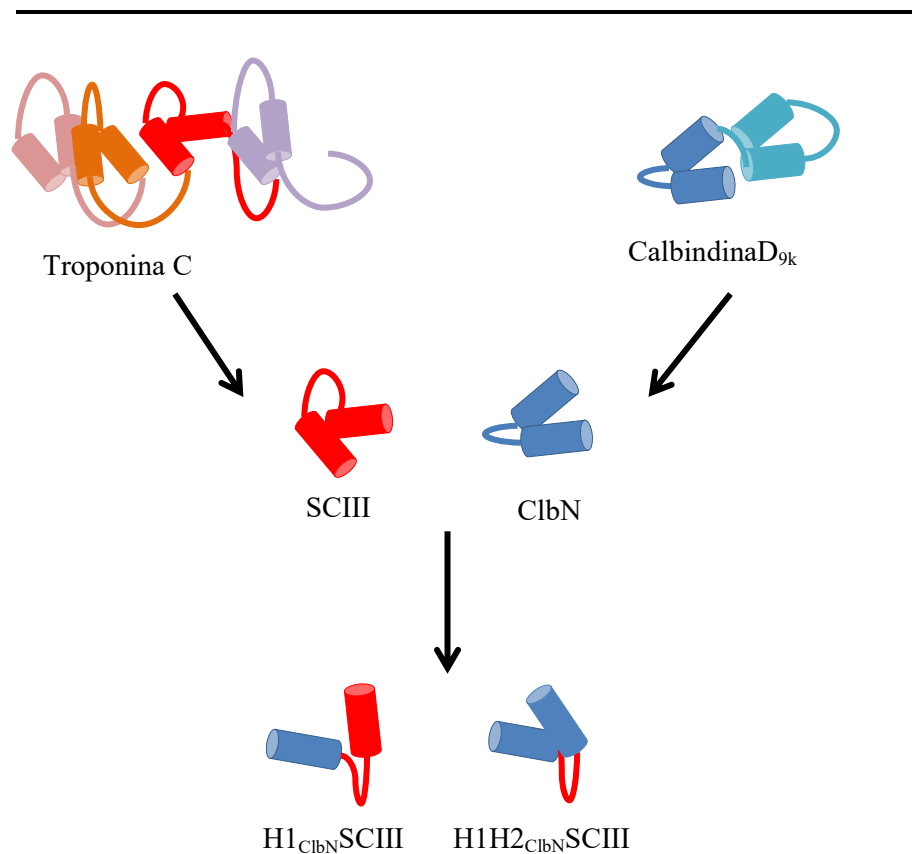
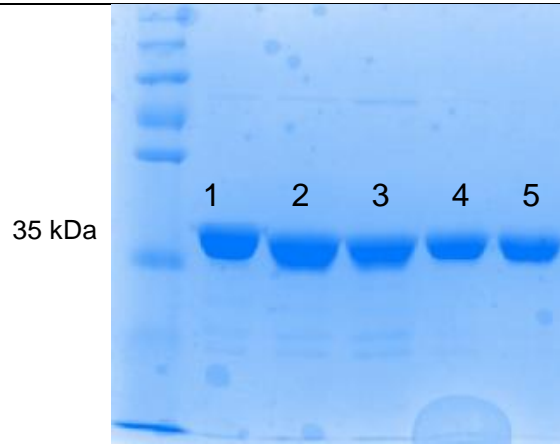


Figura 10. EF-hand quiméricos. Se muestra una representación de las distintas construcciones generadas. Las hélices α se muestran como cilindros.

Purificación de las proteínas fusionadas

Todas las variantes fueron sobre-expresadas y purificadas exitosamente (Figura 11). Para cada una de las mismas se determinó el rendimiento de la purificación obtenida a partir de un litro de cultivo (aproximadamente a 95% de pureza determinado por densitometría en el gel SDS-PAGE).

Figura 11. Proteínas purificadas. 1:ClbN-Tyra, 2:SCIII-TyrA, 3: H1_{ClbN}SCIII.-TyrA 4: H1H2_{ClbN}SCIII-TyrA y 5:JoMut-TyrA



Proteína	Concentración en mg/L
ClbN-TyrA	12.8
SCIII-TyrA	7
H1 _{ClbN} SCIII-TyrA	31.5
H1H2 _{ClbN} SCIII-TyrA	20.5
JoMut	10.8

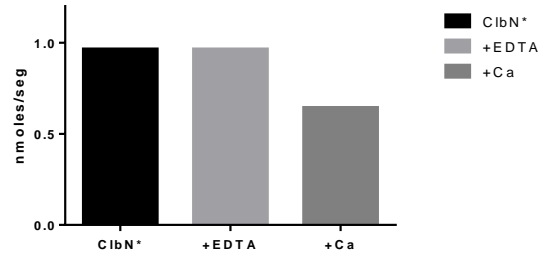
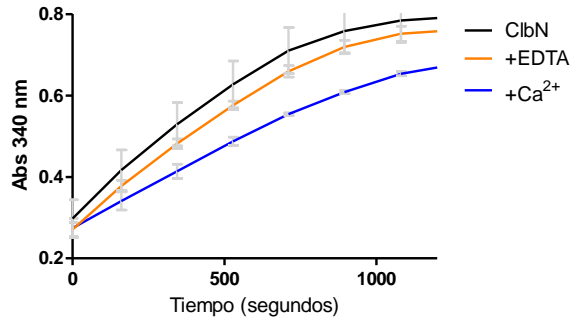
Tabla 5. Concentraciones obtenidas de la purificación de las proteínas de fusión EF-hand-TyrA

La concentración de la proteína purificada se determinó mediante el método de Bradford.

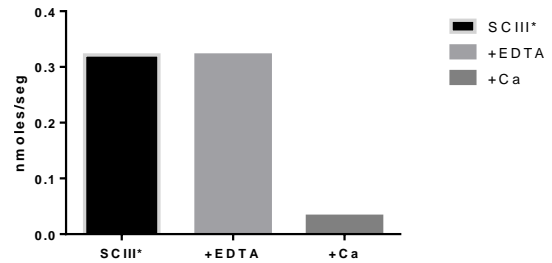
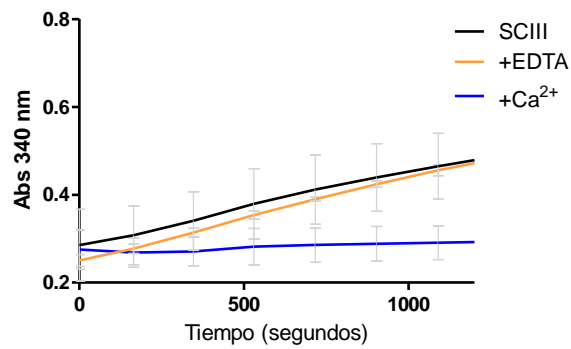
Ensayos de la actividad enzimática de TyrA

Los ensayos de actividad se realizaron por triplicado, se utilizó 2 µg de la proteína pura y se monitoreó la aparición de NADH. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 12.

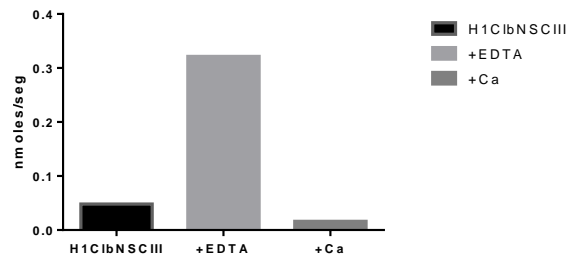
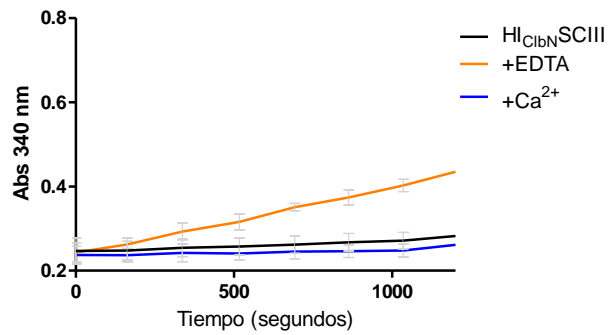
A. ClbN-TyrA



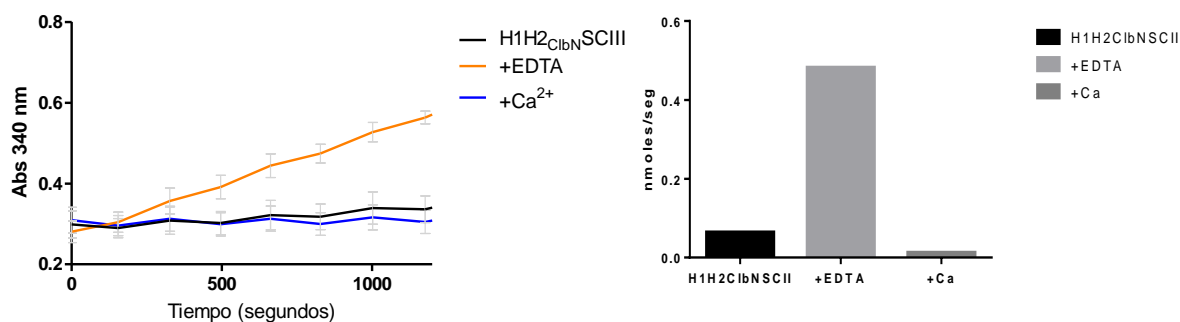
B. SCIII-TyrA



C. ClbN_{HI}SCIII-TyrA



D. ClbN_{HH2}SCIII-TyrA



E. JoMut-TyrA

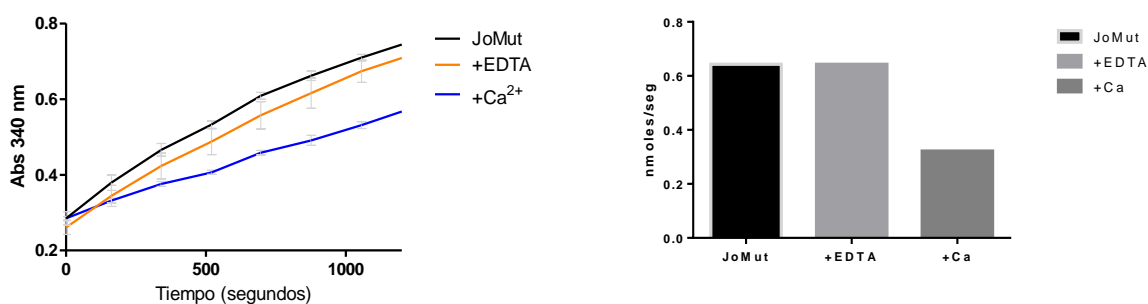


Figura 12: Actividad enzimática de TyrA en las proteínas de fusión EF-hand-TyrA. Absorbancia a 340 nm. Izquierda, gráficas de actividad enzimática para cada proteína de fusión. Derecha, producción de NADH en la reacción. Se muestra el comportamiento de la variante sin tratamiento (nombre de la variante), sin Ca²⁺ (+EDTA) y con calcio (+Ca²⁺).

El análisis de la actividad enzimática mostró que todas las variantes analizadas presentan la formación de dímeros tal como ya se había reportado⁴¹.

La proteína de fusión ClbN-TyrA muestra actividad del reportero sin importar la ausencia o presencia de Ca²⁺, aunque en presencia de calcio se ve disminuida en aproximadamente un 30% con respecto a la forma libre de calcio. Este cambio, si bien nos habla de ligeros

cambios conformacionales, éstos no son suficientes para desestabilizar de forma importante el dímero de TyrA. Se observa que esta proteína de fusión se encuentra libre de Ca^{2+} luego del proceso de purificación ya que su actividad es similar a la observada en presencia de EDTA.

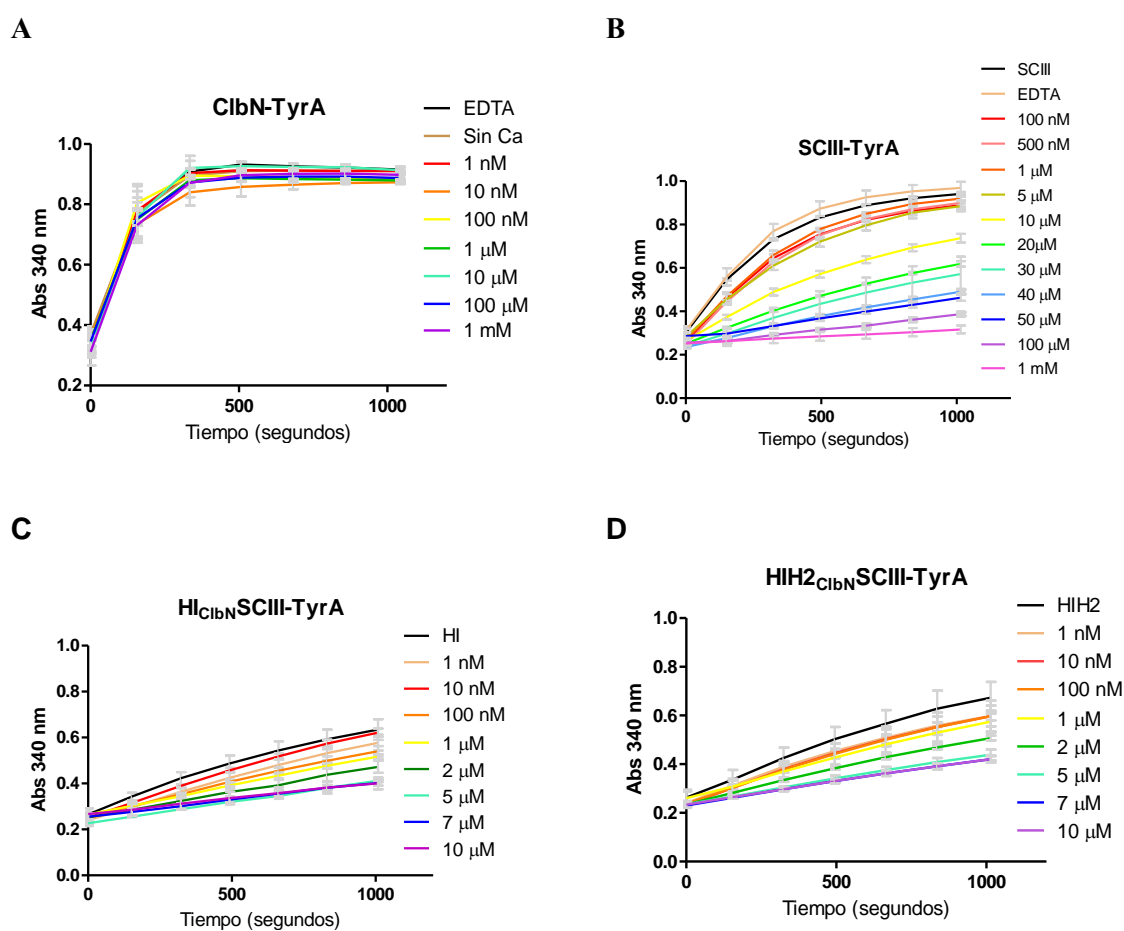
En contraste, la proteína SCIII-TyrA, muestra el comportamiento tipo *switch*, el cual fue previamente reportado por nuestro grupo⁴¹. En presencia de calcio la actividad del reportero prácticamente se elimina, lo cual indica que, debido a los cambios conformacionales inducidos por la unión a Ca^{2+} en el motivo EF-hand se desestabiliza el dímero de TyrA, el cual es necesario para su actividad enzimática; por otro lado se observa también que esta proteína viene libre de calcio luego de la purificación, pues presenta una actividad importante de TyrA que no se ve alterada por la presencia de EDTA, lo que sugiere una menor afinidad respecto a la proteína de fusión ClbN-TyrA.

Las proteínas $\text{HI}_{\text{ClbN}}\text{SCIII-TyrA}$ y $\text{HIH2}_{\text{ClbN}}\text{SCIII-TyrA}$ muestran un comportamiento similar al tipo *switch* observado en SCIII-TyrA, ya que sólo en ausencia de calcio muestran actividad de TyrA, la cual prácticamente desaparece en presencia del ión. Sin embargo, es interesante resaltar que las proteínas recién purificadas, presentan una actividad muy disminuida, indicando que se encuentran con Ca^{2+} unido desde su expresión. Esto nos podría indicar una mayor afinidad por Ca^{2+} que los módulos tipo silvestre debido quizá a un cambio en la constante de disociación en comparación al módulo silvestre.

Finalmente la proteína JoMut muestra un comportamiento más parecido al de la proteína moduladora, la cual presenta actividad elevada en ausencia de calcio, mientras que cuando une calcio dicha actividad solo se ve disminuida ligeramente indicando que el rearrreglo inducido por el Ca^{2+} es mínimo, y no es suficiente para desestabilizar el dímero de TyrA. Esto concuerda con los resultados de Johansson y colaboradores³² de manera que los cambios realizados en este EF-hand, los cuales fueron encaminados para convertir este EF-hand no canónico en uno canónico, no son suficientes para conferirle un comportamiento sensor a nivel de motivo individual, ni en el contexto de la proteína completa Calbindina $\text{D}_{9\text{k}}$, tal y como lo reportó el mismo grupo.

Determinación de constantes de unión a calcio aparentes de las proteínas Calbindinas D_{9k} quiméricas

De acuerdo al comportamiento observado en la actividad del sistema reportero en presencia y ausencia de calcio se determinaron las constantes de afinidad aparente a calcio de aquellas proteínas de fusión que mostraban un cambio robusto en la actividad de la proteína reportera. Los perfiles de actividad observados a diferentes concentraciones de calcio se muestran a continuación (Figura 13):



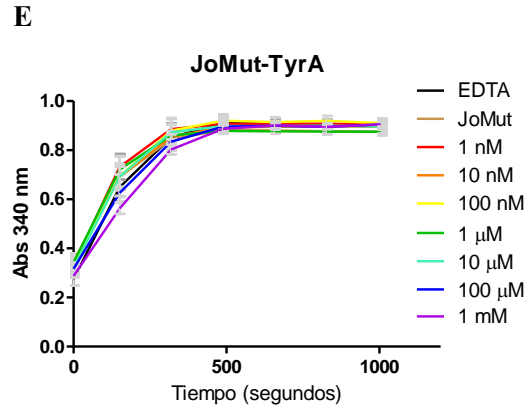


Figura 13. Perfiles de actividad enzimática de las proteínas de fusión a diferentes concentraciones de calcio.

Se observó que las proteínas de tipo modulador; ClbN-TyrA y JoMut-TyrA no muestran cambios importantes en la actividad del reportero en las diferentes concentraciones de calcio analizadas, mientras que las de tipo sensor, presentan actividad enzimática dependiente de la concentración de calcio en la reacción. Debido a lo observado en las proteínas de fusión con comportamiento sensor, se determinaron constantes de afinidad a calcio aparentes mediante el ajuste de las velocidades iniciales en las distintas concentraciones de calcio a la ecuación de Michaelis Menten para las variantes $HI_{ClbN}SCIII-TyrA$ y $HIH2_{ClbN}SCIII-TyrA$, mientras que el comportamiento de SCIII se ajustó a una ecuación de Bidosis-respuesta usando el programa OriginLab. Los ajustes se muestran en el anexo 4.

En la tabla 6 se muestran las constantes de afinidad a calcio obtenidas para los homodímeros SCIII, $HI_{ClbN}SCIII$ y $HIH2_{ClbN}SCIII$ con nuestro sistema reportero, así como afinidades reportadas previamente para el homodímero SCIII y el módulo ClbN. Se ha reportado que las constantes de disociación encontradas para péptidos individuales son mucho mayores a las de los mismos sitios en la proteína completa³⁹. Para el homodímero SCIII se determinaron dos Kd, una de 3 μM y otra de 1 mM, sin embargo la Kd determinada para este mismo sitio en la proteína completa es de 20 nM³⁹. Con nuestro sistema reportero determinamos para este sitio dos afinidades aparentes de unión a Ca^{2+} ; una de 7 μM y otra de 39 μM , siendo el primer valor muy cercano al reportado previamente, sin embargo, el segundo de los valores muestra afinidades mayores a las reportadas para este dímero. El hecho de que se observen dos constantes de afinidad nos sugiere una falta de cooperatividad en la unión del calcio en un par EF-hand.

EF-hand	Afinidad a Ca ²⁺	Afinidades determinadas mediante el sistema EF-hand-TyrA
Sitio III con IV de TnC	K _d =20 nM ³⁷	
C1bN	K _d =20 nM ²²	
SCIII	K _d = 3 μM ³⁸ K _d =1mM ³⁸	K _m _{ap} = 7 μM K _m _{ap} = 39 μM
HI _{C1bN} SCIII		K _m _{ap} = 68 nM
HIH2 _{C1bN} SCIII		K _m _{ap} = 1 μM

Tabla 6. Constantes de afinidad reportadas para el sitio III de Troponina, C1bN y el homodímero SCIII y constantes de afinidad obtenidas mediante nuestro sistema reportero para los módulos SCIII, HI_{C1bN}SCIII y HIH2_{C1bN}SCIII.

En el caso del módulo quimérico HI_{C1bN}SCIII se encuentra en el mismo intervalo de los reportados en el módulo C1bN en el contexto de la proteína completa, de manera que la afinidad se ve poco afectada por los cambios realizados, sin embargo presenta ya un cambio conformacional dependiente de calcio parecido al motivo sensor.

Finalmente, para la variante HIH2_{C1bN}SCIII se observó un constante de afinidad aparente de 1 μM, la cual es cercana a las observadas en los reportes previos de módulos SCIII individuales, y al igual que este motivo presenta también ya un cambio conformacional dependiente de Ca²⁺. El determinar solo una constante de afinidad aparente para ambas proteínas quiméricas puede indicar un alto grado de cooperatividad, a diferencia del homodímero SCIII. Otro resultado interesante, es que el módulo que presenta un mayor contenido proveniente de la proteína SCIII presenta mayor afinidad por Ca²⁺ que aquel donde solo se cambió el asa de unión a Ca²⁺.

Determinación de la oligomerización de las proteínas de fusión

El análisis del estado de oligomerización de las proteínas quiméricas EF-hand –TyrA se muestra en la figura 14.

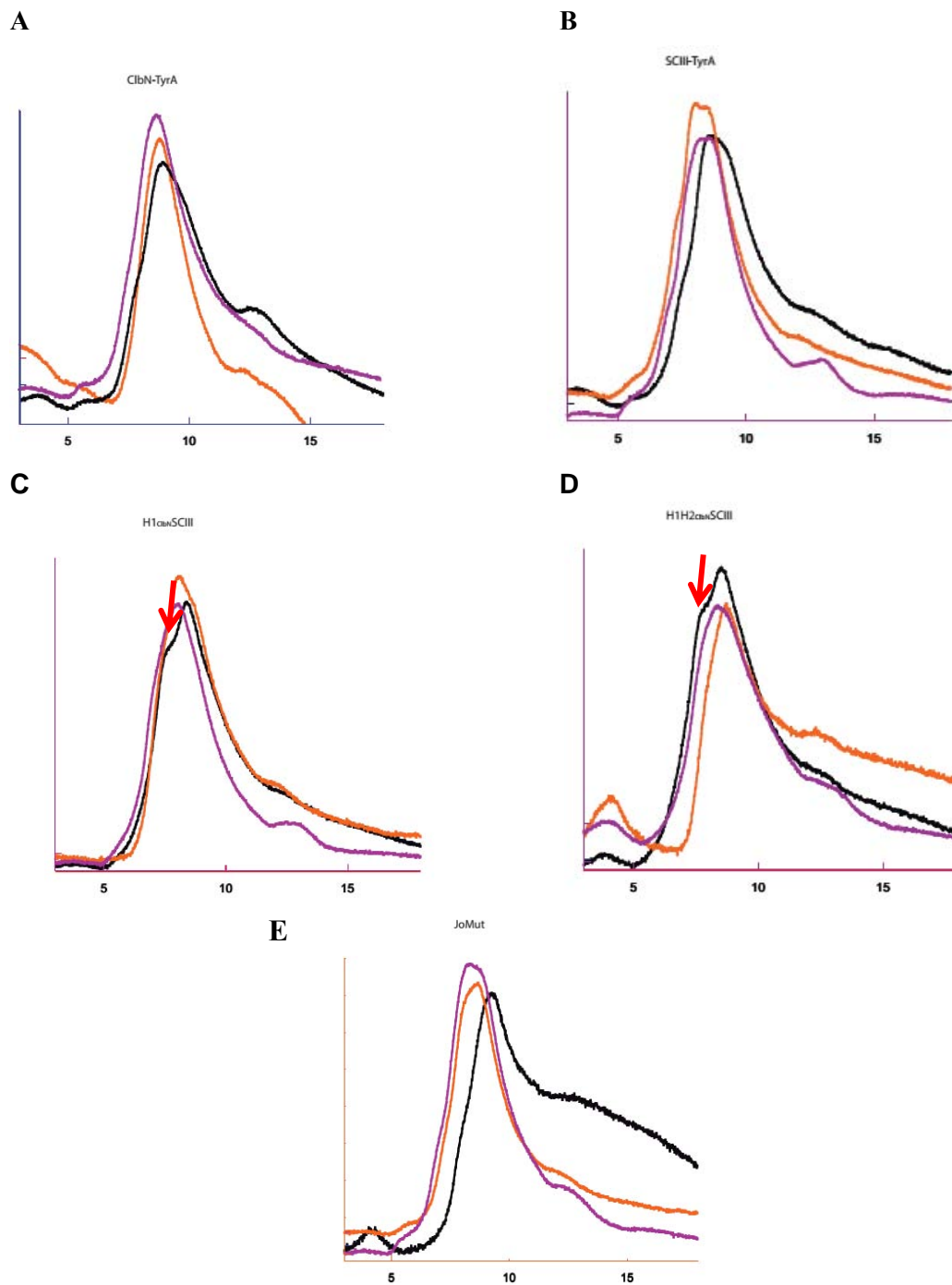
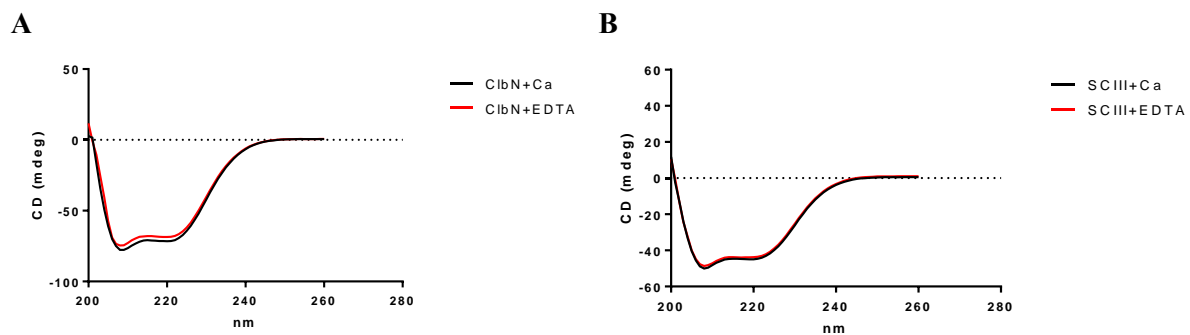


Figura 14. Cromatogramas de cada variante usando una columna de exclusión molecular: En magenta la proteína pura, en negro la proteína pura en presencia de 2mM de calcio y en naranja la proteína pura con 1mM de EDTA

De manera general se observa que la formación de dímero está presente en todas las proteínas. Sin embargo, se observa un pico que indicaría un mayor grado de oligomerización (señalado con una flecha roja) en las mutantes HI_{CibN}SCIII y HIH2_{CibN}SCIII en presencia de calcio. Por otro lado, la variante JoMut muestra un retardamiento en la elución, lo cual, de acuerdo con lo observado en las pruebas de actividad podría reflejar la presencia de varios “conformeros”, algunos de los cuales logran aun estabilizar a la proteína TyrA y por ello la actividad se ve disminuida. La presencia de dímeros en las tres condiciones fue reportado también previamente por nuestro grupo⁴¹ y corrobora el hecho de que los cambios en la actividad enzimática del reportero, se debe a cambios en la orientación del dímero de TyrA provocado por el cambio conformacional inducido por la unión del Ca²⁺ en el motivo EF-hand tipo sensor y no por el rompimiento del dímero de las proteínas de fusión

Análisis de los cambios en la conformación de las proteínas de fusión mediante dicroísmo circular

Para determinar si los cambios observados en los ensayos de actividad enzimática se deben a cambios en la estructura secundaria de las proteínas de fusión o solo a cambios en la dirección de las hélices en los motivos EF-hand se realizó un análisis mediante dicroísmo circular (CD) cuyos resultados se muestran en la figura 15.



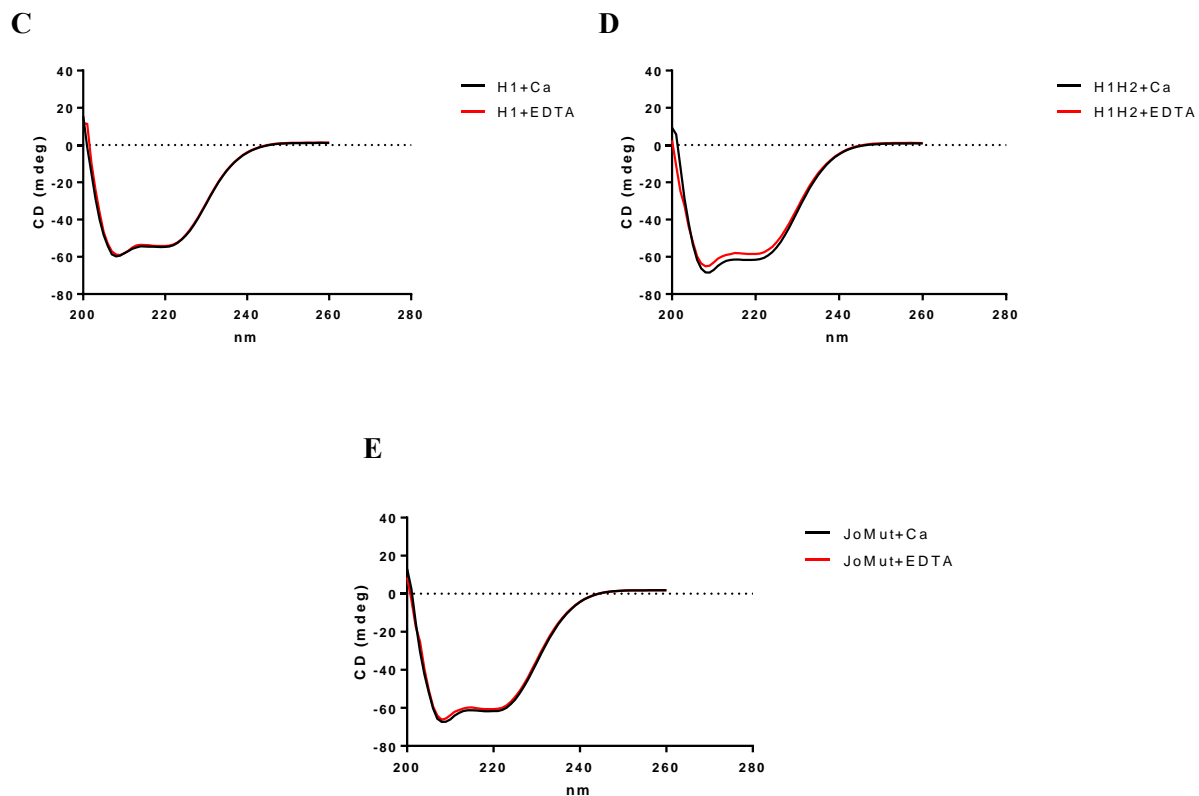


Figura 15. Espectros de CD de las diferentes construcciones fusionadas a TyrA en presencia de 1 mM de Ca^{2+} (trazo negro) y ausencia (trazo rojo) de Ca^{2+} .

El análisis por dicroísmo circular (figura 15) nos muestra un espectro típico de hélices α , debido a que tanto el módulo EF-hand como TyrA poseen una estructura basada principalmente en hélices α . Los ensayos de actividad enzimática sugieren que aun en ausencia de Ca^{2+} debía darse la formación de dímeros con lo cual podíamos decir que los motivos EF-hand están estructurados. Esta hipótesis es corroborada por los análisis de dicroísmo circular, pues observamos que tanto en ausencia como en presencia de calcio, la estructura se mantiene constante, de modo que los cambios observados en la actividad enzimática de las proteínas de fusión $\text{HI}_{\text{CibN}}\text{SCIII}$ y $\text{HIH2}_{\text{CibN}}\text{SCIII}$, así como en SCIII puede deberse a la modificación de la orientación de las hélices de los módulos EF-hand inducido por la unión a Ca^{2+} .

Para las proteínas de fusión ClbN y JoMut se observa también que la estructura secundaria permanece constante en presencia y ausencia de Ca^{2+} , mostrando que la estructura de estos módulos tampoco se modifica en ninguna de las condiciones.

Es importante mencionar que, el hecho de no observar cambios conformacionales evidentes en ninguna de las condiciones analizadas, ni de manera diferencial entre proteínas de fusión con motivos moduladores y sensores, puede ser debido a que la señal de la proteína reportera TyrA, cuyo tamaño es mucho mayor que el de los módulos analizados, sea la que predomine en los espectros, enmascarando así cualquier cambio debido a estos módulos EF-hand.

Análisis de exposición de zonas hidrofóbicas mediante la interacción con ANS

Para determinar si existen cambios conformacionales que expongan regiones hidrofóbicas al unir calcio, se determinó el espectro de fluorescencia de ANS en solución de las construcciones que contienen el módulo sensor y el modulador en presencia y en ausencia de calcio. Los espectros obtenidos se muestran a continuación:

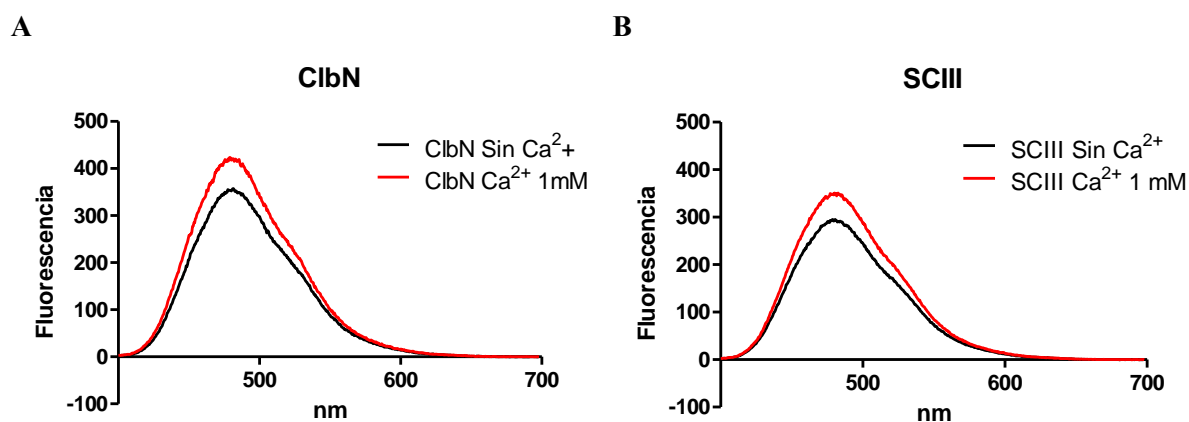


Figura 16. Espectros de emisión de las variantes proteicas en presencia de 1,8-ANS en ausencia (línea negra) y presencia de calcio (línea roja).

Se observa que en ambas construcciones se da un aumento en la fluorescencia inducida por Ca^{2+} . Sin embargo, no es posible determinar un comportamiento diferencial entre las proteínas de fusión que tienen un módulo sensor y las que tienen un módulo modulador. Este cambio sugiere la exposición de nuevas regiones luego de la interacción con calcio, sin embargo es necesario determinar la contribución en la fluorescencia por la proteína reportera así como zonas del módulo EF-hand ahora expuestas que pudieran ser enmascaradas por el reportero debido a su cercanía y tamaño. Adicionalmente se realizó un análisis de fluorescencia usando el lector de placa Safire controlada por la plataforma TECAN (Tecan Group LTD, Männedorf, Suiza) de todas las construcciones el cual se presenta en el anexo 4.1 y que muestran el mismo comportamiento que en la figura 16.

PARTE 2. REINSERCIÓN DE LOS MÓDULOS CONSTRUIDOS A LA PROTEÍNA CALBINDINA D_{9k} Y ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA COMPLETA

Obtención de los genes codificantes de las proteínas Calbindina D_{9k} reinsertando los módulos construidos

Se construyeron 5 plásmidos que contienen los genes que codifican para la proteína Calbindina D_{9k} (ClbD_{9k}) y las variantes con los módulos construidos: ClbD_{9k}SCIII, ClbD_{9k}-HIC1bNSCIII, y ClbD_{9k}-HIH2C1bNSCIII y ClbD_{9k}-JoMuT.

Proteína	Secuencia de residuos de aminoácidos
ClbD _{9k}	MAHHHHHHKSPEELKGIFEKYAAKEGDPNQLSKEELKLLLQTE FPSLLKGPSTLDELFEELDKNGDGEVSFEFFQVLVKKISQ
ClbD _{9k} SCIII	MAHHHHHHKSEEELANAFRIFDKNADGYIDIEELGEILRATGFP SLLKGPSTLDELFEELDKNGDGEVSFEFFQVLVKKISQ
ClbD _{9k} - HIC1bNSCIII	MAHHHHHHKSPEELKGIFEKYDKNADGYIDIEELGEILRATGFP SLLKGPSTLDELFEELDKNGDGEVSFEFFQVLVKKISQ
ClbD _{9k} - HIH2C1bNSCIII	MAHHHHHHKSPEELKGIFEKYDKNADGYIDKEELKLLLQTEFP SLLKGPSTLDELFEELDKNGDGEVSFEFFQVLVKKISQ
ClbD _{9k} -JoMuT	MAHHHHHHKSPEELKGIFEKYDKEGDGQLSKEELKLLLQTEFP SLLKGPSTLDELFEELDKNGDGEVSFEFFQVLVKKISQ

Tabla 7. Secuencia de residuos aminoacídicos de las proteínas Calbindina D_{9k} WT y las variantes construidas

Las proteínas obtenidas tienen un peso aproximado de 9.5 kDa y poseen una cola de seis histidinas para fines de purificación. La Calbindina D_{9k} corresponde a la proteína silvestre; la ClbD_{9k}-SCIII posee el sitio III de la proteína Troponina C que sustituye el módulo N terminal de la Calbindina D_{9k} de modo que ambos sitios corresponden ahora a EF-hand de tipo canónico. ClbD_{9k}-HIC1bNSCIII, y ClbD_{9k}-HIH2C1bNSCIII y ClbD_{9k}-JoMuT consisten en la

inserción de los módulos EF-hand quiméricos correspondientes en el extremo N de Calbindina D_{9k} tal y como se muestra en la figura 17.

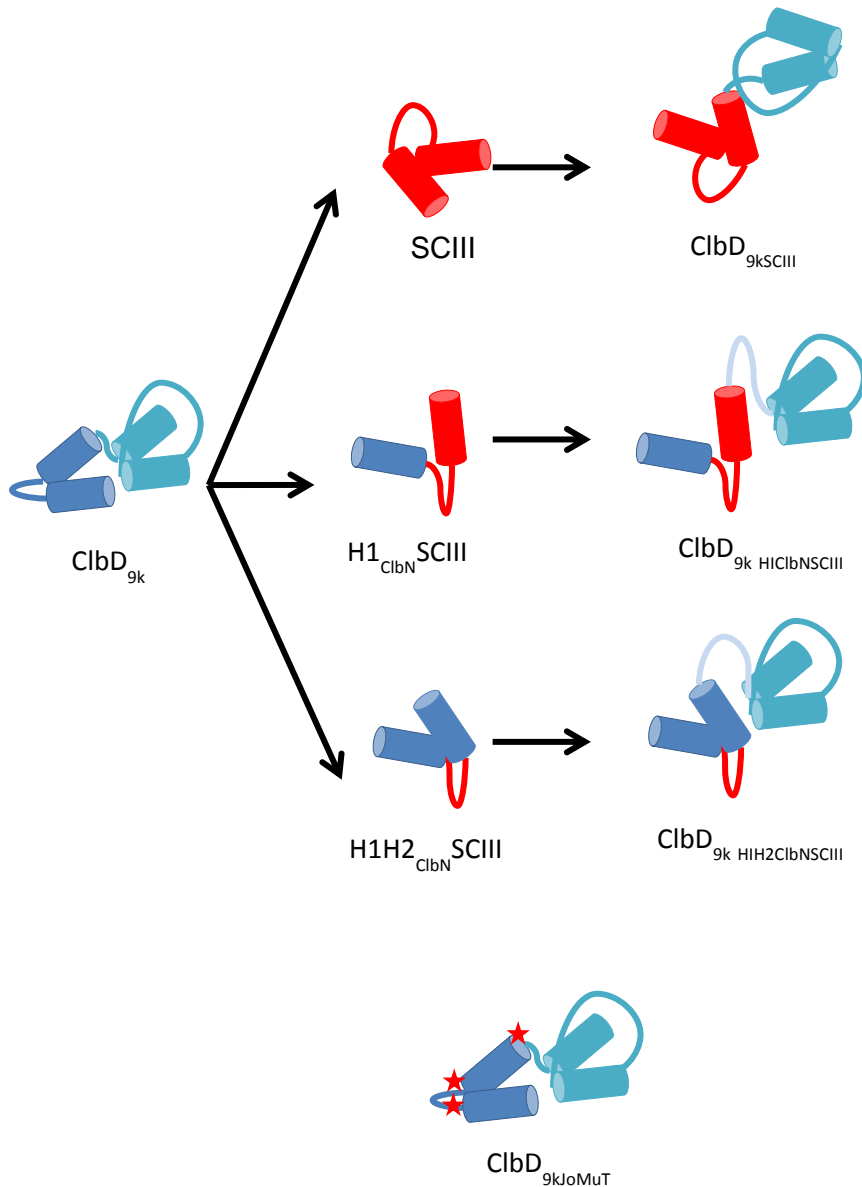


Figura 17. Esquema de las Calbindinas D_{9k} con los EF-hand reinsertados quiméricos. Se muestran las 5 construcciones generadas: ClbD_{9k}, ClbD_{9k}-SCIII, ClbD_{9k}-H1CibN-SCIII, y ClbD_{9k}-H1H2CibN-SCIII y ClbD_{9k}-JoMuT. Las hélices se muestran como cilindros.

Expresión y purificación de las proteínas Calbindina D_{9k} quimeras

La expresión y purificación de las proteínas se llevó a cabo como se describió previamente para las proteínas fusionadas a TyrA. Adicionalmente se realizó una diálisis para eliminar el exceso de imidazol usado para fines de purificación, así como para eliminar el calcio presente en las proteínas para realizar análisis en ausencia y presencia de calcio. El proceso de diálisis se describe en el anexo 3.2.

Análisis para determinar si existe un cambio conformacional en la proteína completa de Calbindina D_{9k}.

Con el fin de determinar el efecto de la unión del calcio en las proteínas Calbindina D_{9k} quiméricas se realizó un análisis de posibles cambios en la exposición de zonas hidrofóbicas, así como cambios en la estructura secundaria mediante dicroísmo circular.

El análisis por dicroísmo circular se realizó debido a que se han observado cambios en la estructura secundaria en proteínas unidoras de calcio del tipo sensor como la calmodulina al unir a calcio. Por otro lado, los cambios inducidos por el calcio en la Troponina C, se ha determinado que corresponden más que a un cambio en la estructura secundaria de la proteína, a un rearrreglo en su estructura terciaria.

El análisis por dicroísmo circular de las proteínas se realizó en presencia y ausencia de calcio. El análisis en presencia de calcio se llevó a cabo usando una concentración final de Ca^{2+} 1 mM. Los resultados para cada proteína en ambas condiciones se muestran en la figura 18.

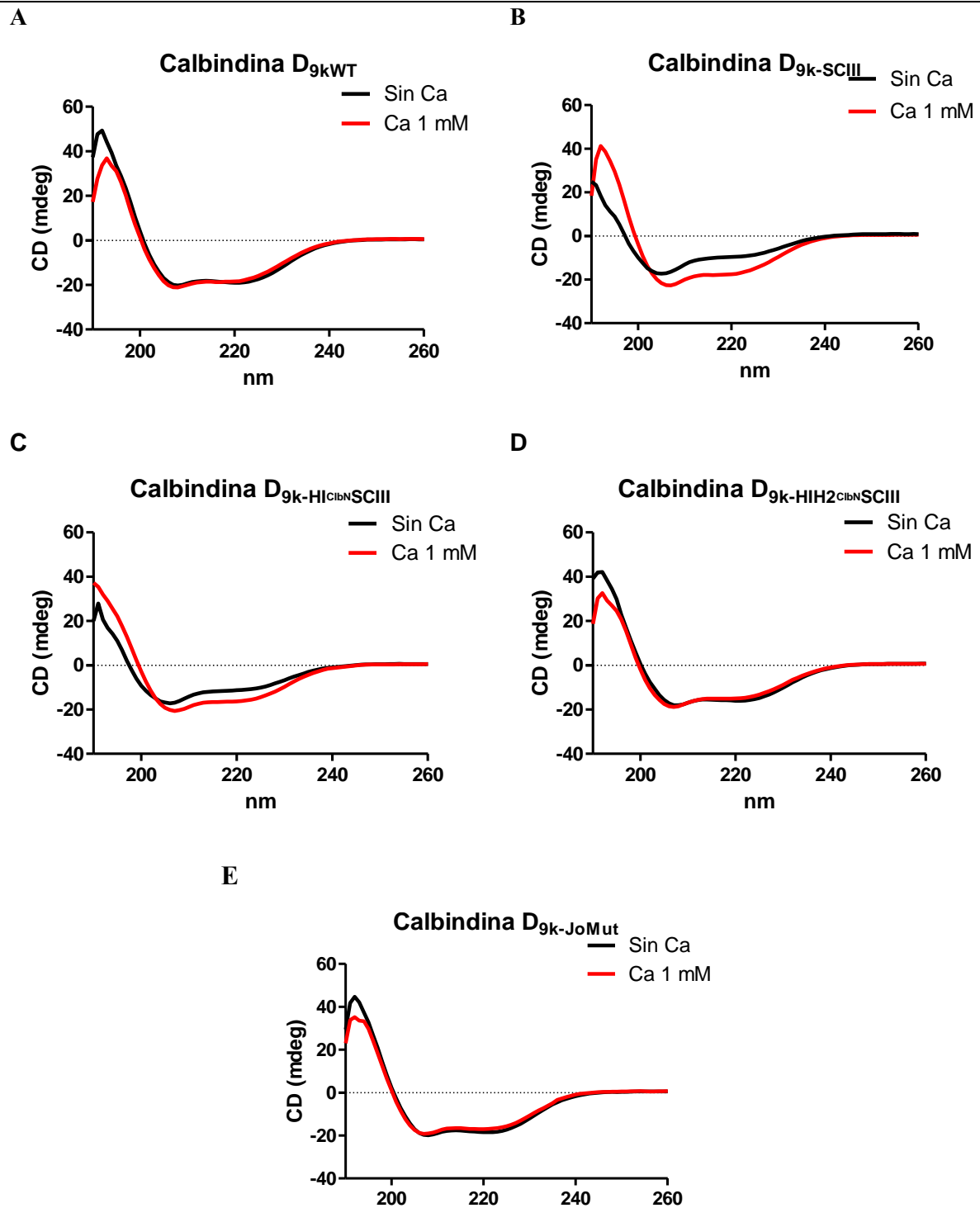


Figura 18. Espectros de dicroísmo circular para las proteínas Calbindinas D_{9k} silvestre y quimeras en ausencia (trazo negro) y presencia (trazo rojo) de calcio (1 mM).

Variante	Condición	Porcentaje de hélices α
ClbD _{9k} -WT	Sin Ca ²⁺	37.5
	1mM Ca ²⁺	37.8
ClbD _{9k} -SCIII	Sin Ca ²⁺	19.4
	1mM Ca ²⁺	35.8
ClbD _{9k} -HIC1bNSCIII	Sin Ca ²⁺	23.4
	1mM Ca ²⁺	31.2
ClbD _{9k} -HIH2C1bNSCIII	Sin Ca ²⁺	33.2
	1mM Ca ²⁺	31.7
ClbD _{9k} -JoMut	Sin Ca ²⁺	35.7
	1mM Ca ²⁺	34.9

Tabla 8. Porcentaje de hélices α calculado utilizando el algoritmo Selcon 3 (The Self-Consistent Method). El análisis fue realizado para ambas condiciones. En ausencia de Ca²⁺ y presencia de Ca²⁺.

En la tabla 8 se muestra el porcentaje de hélices α calculado para cada una de las variantes bajo las dos condiciones analizadas.

En este análisis se observó que tal como se ha reportado previamente⁶, la proteína Calbindina D_{9k} no sufre cambios en la estructura secundaria luego de la unión de Ca²⁺, pues la unión a calcio solo provoca la reorganización de algunos ligandos para la coordinación del ión, así el porcentaje de hélices calculado prácticamente se mantiene constante. Este comportamiento es también observado en la proteína quimérica Calbindina D_{9k}-JoMut y es acorde a lo reportado por Johansson y colaboradores³², quienes encontraron que los cambios que realizaron con el fin de modificar el EF-hand no canónico de la Calbindina D_{9k} (ClbN) no fueron suficientes para conferir un comportamiento sensor en esta. Por otro lado, es interesante el comportamiento observado en las variantes Calbindina D_{9k}-SCIII y Calbindina D_{9k}-HIC1bNSCIII, donde se observa un aumento en la elipticidad de las proteínas inducido por la unión del calcio, y según el análisis de porcentaje de hélices α calculado, hay un aumento considerable en ambas proteínas provocado por la unión a Ca²⁺, dicho cambio puede deberse ya sea a un cambio en la estructura secundaria inducida quizá en el conector inter EF-hand o a un cambio en la organización de la estructura terciaria. Este

comportamiento ha sido observado en proteínas de tipo sensor como la proteína calmodulina, prototipo de este grupo de proteínas⁶.

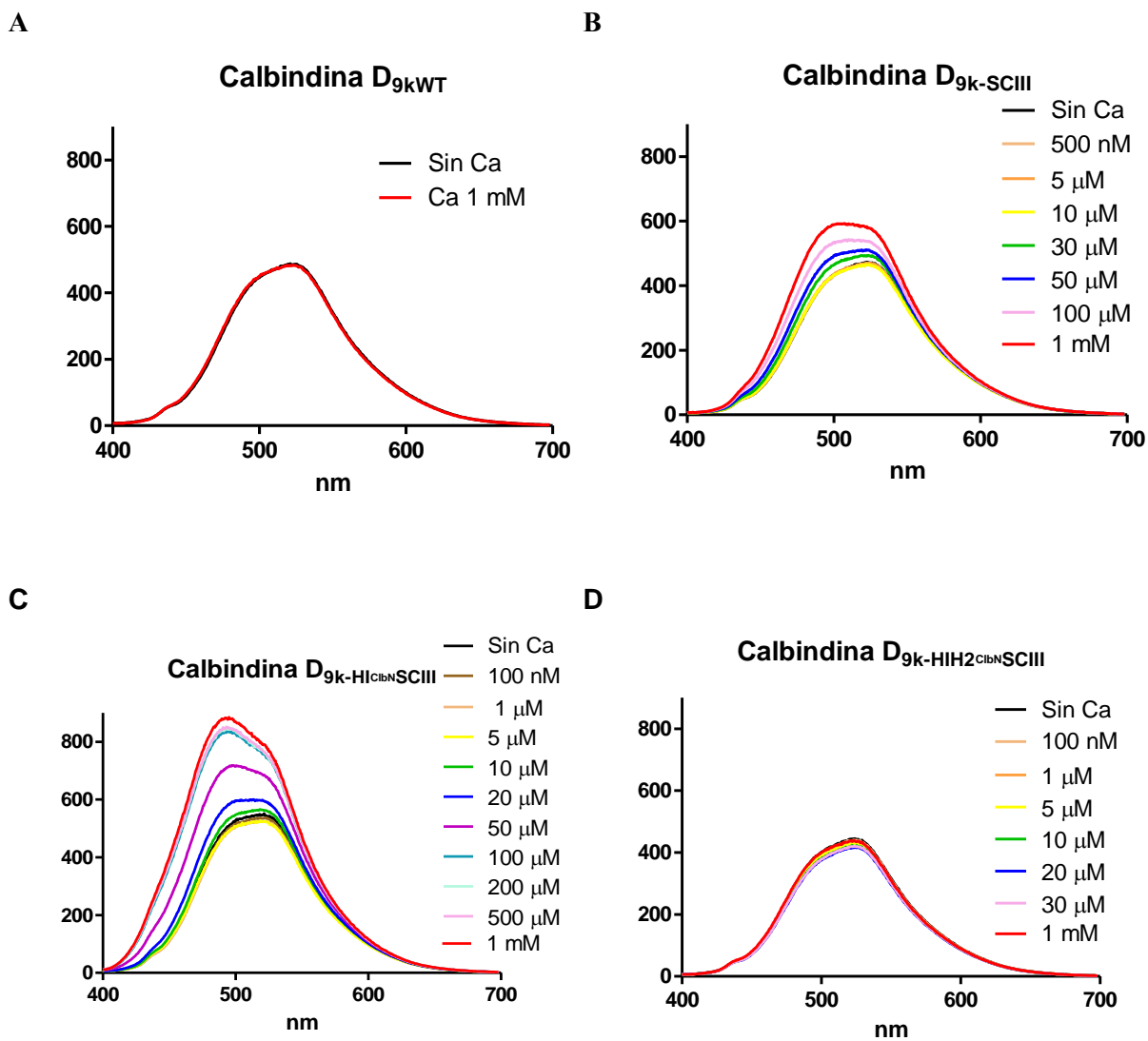
El comportamiento observado en estas dos variantes puede deberse a que se desestabiliza el núcleo hidrofóbico altamente estable, característico de la proteína Calbindina D_{9k} y que se forma mediante interacciones entre las hélices α del EF-hand N terminal y las del EF-hand C terminal. En el caso de la variante Calbindina D_{9k-SCIII} las hélices α de EF-hand N terminal provienen del motivo SCIII, de manera que las nuevas interacciones con estas hélices α rompen el núcleo hidrofóbico o lo forman de una manera poco estable, de modo que los cambios conformacionales dependientes de Ca²⁺ que se indujeron con los cambios en un EF-hand no se evitan con estas interacciones y provocan además un cambio en la proteína completa. Un efecto similar se observa en la variante Calbindina D_{9k-HIC1bNSCIII}, a pesar de solo poseer una hélice del motivo SCIII.

Cabe resaltar que ambas variantes contienen la hélice II proveniente de SCIII, lo cual puede además interrumpir las interacciones establecidas naturalmente entre el conector inter-EF-hand y las hélices II y III que mantienen en Calbindina D_{9k} las zonas hidrofóbicas enterradas como lo reporta Bunick y colaboradores⁶. Además, mantiene los 12 residuos que conforman el sitio de unión a calcio del módulo sensor SCIII los cuales se encuentran distribuidos en el asa y la hélice II.

Sorpresivamente no observamos este comportamiento en la proteína Calbindina D_{9k-HIH2C1bNSCIII}, la cual también había mostrado una desactivación dependiente de calcio en el contexto del sistema reportero, en la cual el porcentaje de hélices α en ambas condiciones es prácticamente constante. Esto puede deberse a que en el caso de esta variante se mantienen las hélices α de la proteína Calbindina D_{9k}, permitiendo el establecimiento del núcleo hidrofóbico que evita los cambios conformacionales inducidos a nivel del motivo IH2C1bNSCIII.

Análisis de fluorescencia extrínseca de las proteínas en respuesta a calcio

Para complementar el análisis realizado por dicroísmo circular se realizó también el análisis de fluorescencia extrínseca mediante unión a ANS del cual se obtuvieron los espectros mostrados en la figura 19:



E

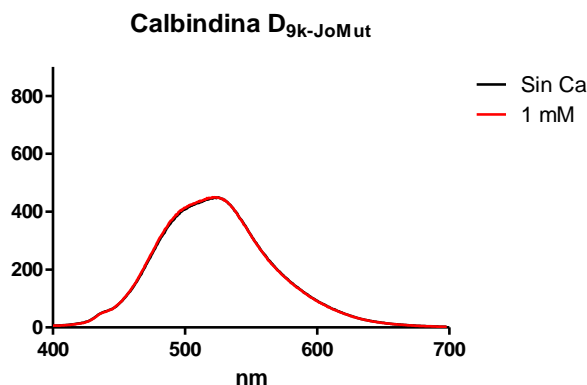


Figura 19. Espectros de fluorescencia extrínseca mediante la interacción con ANS en ausencia (trazo negro) y presencia (trazo rojo) de calcio. Análisis de diferentes concentraciones de calcio para las proteínas en las que se observó un comportamiento sensor según el sistema reportero.

En todos los casos se pueden apreciar dos picos, uno con máximo (λ_{\max}) a 490 nm y otro a 520 nm. En nuestras construcciones observamos, tal como se ha reportado previamente, que la Calbindina D_{9k} no sufre cambios en la fluorescencia debido a la unión con Ca²⁺ pues no presenta exposición de superficies hidrofóbicas⁶. Este mismo fenómeno sucede en la Calbindina D_{9k-JoMut}, mostrando que no existen cambios conformacionales inducidos por la unión del Ca²⁺ tal como se observó mediante el análisis por CD. En ambas proteínas se observa el pico máximo de fluorescencia en aproximadamente 520 nm en presencia y ausencia de Ca²⁺ y un hombro menor a 500 nm.

Por otro lado, en las proteínas con los módulos que tienen componentes de SCIII se observa una modificación entre ambos picos, en ausencia de calcio el pico más grande es el que está alrededor de 520 nm y conforme se aumenta la concentración de calcio, se puede observar un desplazamiento en la proporción de ambos picos hasta el punto en el que el pico a 490 aparece como mayoritario, mientras que el de 520 aparece como un hombro. El corrimiento

del pico hacia longitudes de onda más bajas es indicativo de que el ANS se une a una región más hidrofóbica y por tanto refleja cambios conformacionales inducidos por calcio como se ha reportado para otras proteínas como CaM²⁶. Bunick y colaboradores⁶ reportaron que las interacciones que el conector de unión de los EF-hand establece con las hélices II y III de la proteína pueden impedir la exposición de zonas hidrofóbicas amplias en CMB1, sin embargo, según este análisis, en las proteínas quiméricas construidas en este trabajo ha sido posible romper dichas interacciones.

En la figura 19 se observa que las variantes Calbindina D_{9k}-SCIII y Calbindina D_{9k}-HIC1bNSCIII muestran cambios significativos en la fluorescencia dependiente de calcio. En las concentraciones que van de 0 a 10 μ M de calcio, ambas variantes muestran una ligera disminución en la fluorescencia, indicando una disminución en las zonas hidrofóbicas. El aumento de la fluorescencia en estas variantes y por lo tanto, el aumento en la exposición de regiones hidrofóbicas comienza a observarse a partir de la concentración de calcio correspondiente a 20 μ M. Sin embargo, este cambio parece ser mayor para la proteína Calbindina D_{9k}-HIC1bNSCIII. Si se comparan los espectros de estas proteínas se observa que la que contiene el módulo SCIII completo solo llega a la mitad de los cambios que se observan para la proteína que solo tiene una hélice y el asa SCIII, lo que podría implicar que la variante con el módulo SCIII completo tiene mucho menos afinidad a calcio o que las zonas hidrofóbicas expuestas son menores al unir al calcio. Esto podría estar indicando la relevancia de la hélice 1 de la Calbindina D_{9k} en el aumento de la afinidad por calcio en ese módulo, de tal suerte que con esta quimera se da lugar a una proteína con mayor afinidad

La variante Calbindina D_{9k}-HIH2C1bNSCIII, por otro lado, muestra cambios mínimos en distintas concentraciones de calcio, indicando sólo cambios menores producidos por la unión a calcio, lo cual aunque es contradictorio a lo observado mediante el sistema reportero, es consistente con lo observado en el análisis por dicroísmo circular. Lo observado en la variante Calbindina D_{9k}-HIH2C1bNSCIII puede explicarse debido a que en esta construcción se mantienen las dos hélices de la Calbindina D_{9k}-WT, las cuales establecen interacciones altamente estables con las dos hélices de la parte C terminal de la proteína que dan lugar a la formación del núcleo hidrofóbico altamente estable característico de esta

proteína. Estas fuertes interacciones establecidas entre las hélices podría estar restringiendo el movimiento inducido a nivel de un solo EF-hand, el cual es observado en el contexto del sistema reportero. En el caso del sistema reportero, al ser un análisis de módulos individuales, no se establecen este tipo de interacciones de modo que podemos observar que aunque este módulo individual es flexible, en el contexto de la proteína completa el comportamiento y las características de un EF-hand, está determinado, por las interacciones globales del dominio globular más que por las del EF-hand individual. Esto nos muestra la importancia del establecimiento del apareamiento de los módulos EF-hand en este tipo de proteínas siendo necesario corroborar los análisis de módulos individuales en el contexto de la proteína completa.

CONCLUSIONES

En el contexto de la proteína de fusión se ha podido discriminar entre aquellas proteínas que presentan un comportamiento tipo sensor, de las de tipo modulador. Las proteínas tipo sensor presentan cambio conformacional al unir calcio y al hacerlo desestabilizan la actividad de la proteína reportera TyrA lo que disminuye su actividad. Según los perfiles de actividad enzimática se determinó que las mutantes presentan un comportamiento tipo sensor, mientras la fusión JoMut-TyrA presenta un perfil tipo modulador. También fue posible determinar constantes de unión a calcio aparentes con nuestro sistema reportero mediante el seguimiento de la actividad de TyrA a distintas concentraciones de calcio. La constante de afinidad encontrada para la fusión con el módulo SCIII es cercana a los reportados en la literatura. En el caso de la afinidad de la variante HI_{C1bN}SCIII-TyrA ésta se encuentra en el mismo rango que la reportada para el módulo C1bN (68 nM y 20 nM respectivamente), siendo solo unas tres veces mayor al reportado, sin embargo presenta ya un cambio conformacional típico de las proteínas sensoras.

El análisis conformacional de los módulos construidos en el contexto de las proteínas de fusión al reportero TyrA utilizando dicroísmo circular y fluorescencia extrínseca no arrojó ningún indicio de los cambios conformacionales, debido quizá a la presencia de la proteína reportera. Por esta razón se decidió realizar la reinscripción de los módulos EF-hand analizados previamente a la proteína Calbindina D_{9k-WT}, y caracterizarlas mediante dicroísmo circular y fluorescencia extrínseca en este contexto.

Mediante dicroísmo circular observamos que tal como se ha reportado previamente, la proteína Calbindina D_{9k-WT} no sufre cambios conformacionales dependientes de Ca²⁺ en su estructura secundaria. El mismo comportamiento es observado en la variante Calbindina D_{9k-JoMut} indicando que el cambio del asa no canónica a una canónica no es suficiente para conferir un comportamiento sensor a esta proteína. El comportamiento más interesante es observado en las variantes ClbD_{9k-SCIII} y ClbD_{9k-HIC1bNSCIII} que muestran un aumento en su estructura helicoidal en presencia de calcio, un comportamiento observado en las proteínas de tipo sensor. Este cambio dependiente de Ca²⁺ es también visto mediante el análisis de fluorescencia extrínseca. El hecho de que se observe ya un cambio conformacional

dependiente de Ca^{2+} creemos se debe a que en estas variantes se desestabilizaron las interacciones que forman las 4 hélices presentes en la Calbindina D_{9k} , así como las interacciones que la hélice II de la Calbindina D_{9k} forma con el conector inter-EF-hand y que mantiene los estados apo y holo en una misma conformación para esta proteína. Sorprendentemente, la quimera del módulo que contenía las dos hélices de la Calbindina D_{9k} ($\text{C1bD}_{9k}\text{-HIH2C1bNSCIII}$), a pesar de haber mostrado un comportamiento sensor en los ensayos de actividad, una vez transferido a la Calbindina D_{9k} , no mostró cambios conformacionales dependientes de Ca^{2+} . Esta discrepancia podría deberse a que la presencia del módulo C terminal de la Calbindina $\text{D}_{9k\text{WT}}$ anula la flexibilidad del módulo $\text{HIH2}_{\text{C1bN}}\text{SCIII}$ debido al núcleo hidrofóbico que se forma entre las hélices de ambos módulos.

Finalmente podemos concluir que tanto la reinserción de un módulo sensor a la proteína moduladora Calbindina $\text{D}_{9k\text{WT}}$, así como el intercambio de su asa de unión a calcio y la hélice II por los elementos correspondientes del módulo SCIII de la proteína Troponina C, fueron suficientes para conferir un comportamiento sensor a esta proteína moduladora siendo el más importante el cambio conformacional inducido por Ca^{2+} , estableciendo así que el asa de unión a calcio y la hélice 2 son las unidades mínimas en las que radica el comportamiento sensor debido probablemente a que son los elementos que proveen los residuos de aminoácidos que forman el sitio de unión a calcio de un módulo sensor.

ANEXOS

ANEXO 1. CONSTRUCCIÓN DE GENES

1.1 Construcción de las proteínas de fusión EF-hand-TyrA

20 pmol del oligonucleótido H1ClbNtoSCIIIFor

20 pmol del oligonucleótido Back

200 ng del plásmido *scIII-tyrA*

250 μ M de DNTPs

10 μ l de buffer comercial

2.5 unidades de Taq polimerasa

2.5 mM de MgCl₂

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo siguiendo las siguientes condiciones

	5 Ciclos			15 ciclos			
Desnaturalización inicial	A	B	C	A	B	C	Extensión final
94 °C	94°C	30°C	72°C	94°C	55°C	72°C	72
3 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	1 min	5min

A Desnaturalización, B Alineamiento, C Extensión

1.2 Digestión y ligación

Digestión

El producto de PCR purificado fue digerido con las enzimas NcoI y Pst para su posterior ligación al vector p

Una vez transcurrido dicho tiempo, los fragmentos digeridos se purificaron de acuerdo al protocolo de Roche y se corroboró nuevamente la purificación por una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Ligación

La ligación se llevó a cabo en el vector

Para la reacción de ligación se utilizó:

2 µl de Buffer de Fermentas

10 µl de Inserto (60 ng)

1.5 µl de Ligasa (1.5 U de Fermentas)

2 µl del Vector (100 ng)

4.5 µl de agua grado miliQ

*Volumen final de 20 µl

La ligación fue incubada a 16 °C durante 12 horas y posteriormente fue concentrada por precipitación con butanol.

1.3 PCR para la construcción de los genes que codifican para las proteínas completas Calbindinas D_{9k}

Construcción	Reacción 1	Reacción 2	Reacción 3
CD _{9k} WT	-20pmol For1EFhand2ClbN	-20pmol Calb1NcoH6Forw	-20pmol Calb1NcoH6Forw
	-20pmol Back1EFhand2Clb	-20pmol Back2InterClbN	-20pmol Back1EFhand2Clb
		-200ng del plásmido con la construcción <i>clbN-tyrA</i> (templado)	-10µL de los productos de la reacción 1 y de la

			reacción 2
CD _{9k} -SCIII	-20pmol For1EFhand2ClbN -20pmol Back1EFhand2Clb	-20pmol ForSCIII -20pmol Back2InterSCIII -200ng del	-20pmol ForSCIII -20pmol Back1EFhand2Clb -10 μL de los plásmido con la construcción <i>scIII</i> - <i>tyrA</i> (plantilla)
CD _{9k} -H1 _{ClbN} SCIII	-20pmol For1EFhand2ClbN -20pmol Back1EFhand2Clb	20pmol Calb1NcoH6Forw -20pmol Back2InterClbN -200ng del	-20pmol Calb1NcoH6Forw -20pmol Back1EFhand2Clb -10 μL de los plásmido con la construcción <i>hIclbN-tyrA</i> (plantilla)
CD _{9k} - H1H2 _{ClbN} SCIII	-20pmol For1EFhand2ClbN -20pmol Back1EFhand2Clb	20pmol Calb1NcoH6Forw -20pmol Back2InterClbN -200ng del	-20pmol Calb1NcoH6Forw -20pmol Back1EFhand2Clb -10 μL de los plásmido con la construcción <i>hIh2clbN-tyrA</i> (plantilla)
CD _{9k} -JoMut	-20pmol	20pmol	-20pmol

For1EFhand2ClbN	Calb1NcoH6Forw	Calb1NcoH6Forw
-20pmol	-20pmol	-20pmol
Back1EFhand2Clb	Back2InterClbN	Back1EFhand2Clb
	-200ng del -10 μ L de los plásmido con la construcción <i>JoMutclbN-tyrA</i> (plantilla)	productos de la reacción 1 y de la reacción 2

Cada reacción de PCR de 100 μ l contenía:

250 μ M de DNTPs

10 μ l de buffer comercial

2.5 unidades de Taq polimerasa

2.5 mM de MgCl₂

ANEXO 2. MEDIOS DE CULTIVO Y AMORTIGUADORES

2.1 Lysogeny Broth(LB)

Para 1 litro

- 10 g de Bacto-triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 10 g de NaCl
- 950 ml de agua desionizada

pH ajustado a 7 con NaOH

* Para medio sólido se agrega 15 g de Bacto agar por litro

ANEXO 3. PROTOCOLOS

3.1 Sobreexpresión de proteínas

- I. Se transformaron por electroporación células FA114 con los plásmidos que poseen los genes de cada una de las variantes a estudiar.
- II. Se inocularon 50 µl de las células recuperadas de la electroporación en cajas de LB-Amp-Km y se dejaron crecer 12 horas a 30 °C.
- III. Se tomó una colonia aislada de cada variante para inocular 10 ml de LB-Amp-Km y se incubó toda la noche a 30 °C.
- IV. Con los 10 ml del cultivo se inoculó 1 litro de LB-Amp-Km para cada variante. Se incubó a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una OD_{600 nm} de 0.6.
- V. La expresión de la proteína fue inducida con IPTG 0.5 mM y se continuó la incubación bajo las mismas condiciones durante 4 horas.
- VI. Las células cultivadas fueron colectadas por centrifugación a 6000 rpm en un rotor Beckman JA20 durante 20 min y congeladas a -70 °C para su posterior procesamiento.

3.2 Diálisis

El procedimiento de diálisis para eliminar tanto el exceso de imidazol proveniente del proceso de purificación, así como el Ca²⁺ unido a nuestras proteínas consistió en 8 cambios de la solución de diálisis. Todos los amortiguadores para la diálisis consisten en 10 mM de Tris HCl pH 7.5, 10 mM de NaCl. Del amortiguador 2 al 6 contienen 1 mM de DTT y se realizaron durante 1.5 horas, la diálisis final se dejó durante toda la noche.

La diálisis 1 Se realizó durante 2 horas y el amortiguador contiene EDTA 10 mM y 2 mM de 2-mercaptoetanol.

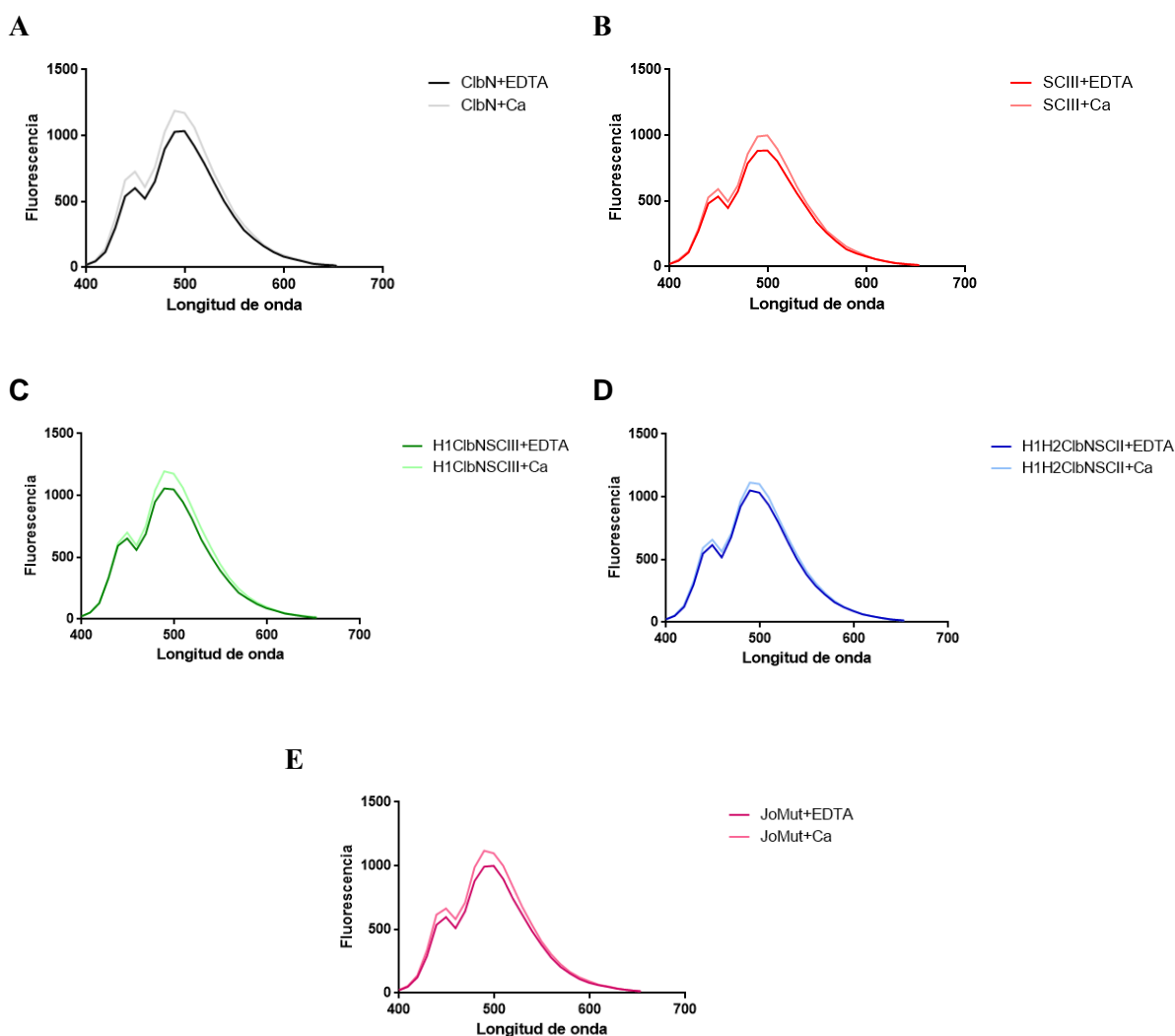
Del amortiguador 2 al 7 se fue disminuyendo la cantidad de EDTA para eliminarlo también en el proceso de la siguiente manera: Diálisis 2: 10 mM de EDTA, diálisis 3: 5 mM EDTA, diálisis 4: 2 mM de EDTA, diálisis 5: 1 mM de EDTA y finalmente las diálisis 6, 7 y 8 no contenían EDTA.

ANEXO 4. RESULTADOS ADICIONALES

4.1 Espectros de fluorescencia para las proteínas de fusión EF-hand-TyrA

Análisis de fluorescencia usando el lector de placa Safire controlada por la plataforma TECAN (Tecan Group LTD, Männedorf, Suiza) de todas las construcciones EF-had-TyrA. Para el análisis en presencia de calcio se utilizó una concentración 2 mM de Ca^{2+} mientras que para el análisis en ausencia de calcio se añadió 1 mM de EDTA.

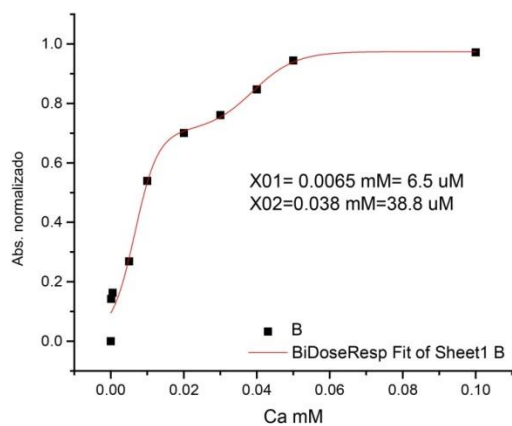
Figura 20. Espectros de emisión de las variantes proteicas en presencia de 1,8-ANS en ausencia (línea oscura) y presencia de calcio (línea clara).



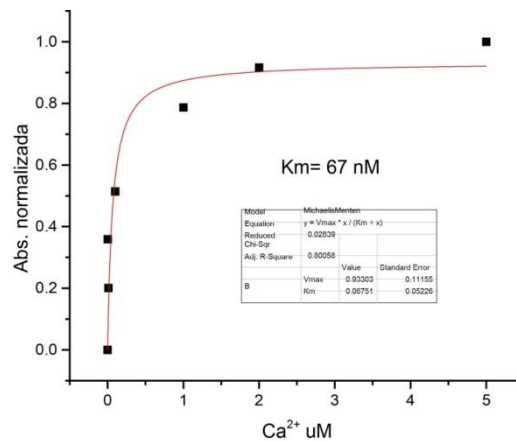
4.2 Curvas y ajustes enzimáticos

Los resultados obtenidos del análisis de actividad enzimática de las proteínas de fusión SCIII-TyrA, HI_{C1bN}SCIII-TyrA y HIH2_{C1bN}SCIII-TyrA son los siguientes:

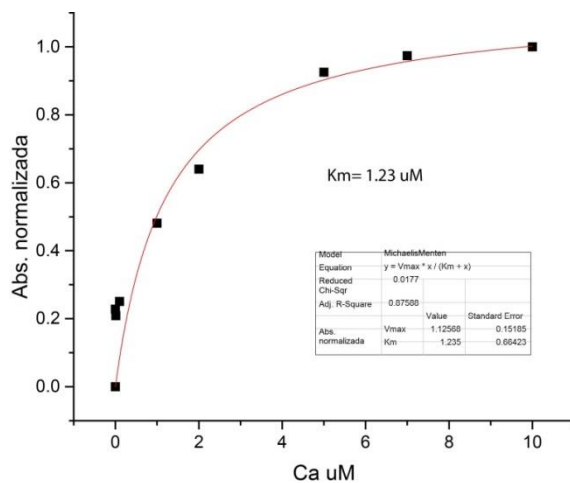
SCIII-TyrA



HI_{C1bN}SCIII-TyrA



HIH2_{C1bN}SCIII-TyrA



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Grabarek, Z. Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **359**, 509-525 (2006).
- 2 Clapham, D. E. Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047-1058, doi:10.1016/j.cell.2007.11.028 (2007).
- 3 Maler, L., Blankenship, J., Rance, M. & Chazin, W. J. Site-site communication in the EF-hand Ca²⁺-binding protein calbindin D9k. *Nat Struct Biol* **7**, 245-250, doi:10.1038/73369 (2000).
- 4 Nelson, M. R., Chagot, B. & Chazin, W. J. *Encyclopedia of Life Sciences.* (JohnWiley&Sons,Ltd, 2010).
- 5 Johnson, C. N., Damo, S. M. & Chazin, W. J. in *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd, 2014).
- 6 Bunick, C. G. *et al.* Designing sequence to control protein function in an EF-hand protein. *J Am Chem Soc* **126**, 5990-5998, doi:10.1021/ja0397456 (2004).
- 7 Kretsinger, R. H. & Nockolds, C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* **248**, 3313-3326 (1973).
- 8 Dupuis, L. & Mousseau, N. Understanding the EF-hand closing pathway using non-biased interatomic potentials. *The Journal of Chemical Physics* **136**, 035101, doi:doi:<http://dx.doi.org/10.1063/1.3671986> (2012).
- 9 Kretsinger, R. H., Uversky, V. N., Permyakov, E. A. *Encyclopedia of Metalloproteins.* (Springer, 2013).
- 10 Shaw, G. S., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. Determination of the solution structure of a synthetic two-site calcium-binding homodimeric protein domain by NMR spectroscopy *Biochemistry* **31**, 9572-9580 (1991).
- 11 Chazin, W. J. Relating form and function of EF-hand calcium binding proteins. *Acc Chem Res* **44**, 171-179, doi:10.1021/ar100110d (2011).
- 12 Babini, E. *et al.* Principal component analysis of the conformational freedom within the EF-hand superfamily. *J Proteome Res* **4**, 1961-1971, doi:10.1021/pr050148n (2005).
- 13 Lewit-Bentley, A. & Réty, S. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 637-643 (2000).
- 14 Skeleton, N. J., Kordel, J., Akke, M., Forsén, S. & Chazin, W. J. Signal transduction versus buffering activity in Ca²⁺-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 239-245 (1994).
- 15 Kawasaki, H. & Kretsinger, R. H. Analysis of the movements of helices in EF-hands. *Proteins* **80**, 2592-2600, doi:10.1002/prot.24143 (2012).
- 16 Mazumder, M., Padhan, N., Bhattacharya, A. & Gourinath, S. Prediction and Analysis of Canonical EF Hand Loop and Qualitative Estimation of Ca²⁺ Binding Affinity. *PLoS One* **9**, e96202, doi:10.1371/journal.pone.0096202 (2014).

- 17 Ikura, M. Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *TIBS* **21**, 14-17 (1996).
- 18 Gifford, J. L., Walsh, M. P. & Vogel, H. J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* **405**, 199-221 (2007).
- 19 Bhattacharya, S., Bunick, C. G. & Chazin, W. J. Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1742**, 69-79, doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.002 (2004).
- 20 Goto, K. *et al.* Ca²⁺ binding sites in calmodulin and troponin C alter interhelical angle movements. *FEBS Lett* **561**, 51-57, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00114-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00114-0) (2004).
- 21 Shaw, G. S., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. Probing the relationship between .alpha.-helix formation and calcium affinity in troponin C: proton NMR studies of calcium binding to synthetic and variant site III helix-loop-helix peptides. *Biochemistry* **30**, 8339-8347, doi:10.1021/bi00098a009 (1991).
- 22 Linse, S. *et al.* A Calbindin D9k Mutant with Reduced Calcium Affinity and Enhanced Cooperativity. Metal Ion Binding, Stability, and Structural Studies. *Biochemistry* **33**, 12478-12486, doi:10.1021/bi00207a015 (1994).
- 23 Shaw, G. S., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. Calcium-induced peptide association to form an intact protein domain: 1H NMR structural evidence. *Science* **249**, 280-283 (1990).
- 24 Julenius, K., Thulin, E., Linse, S. & Finn, B. E. Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k: effects on stability and structure. *Biochemistry* **37**, 8915-8925, doi:10.1021/bi972642d (1998).
- 25 Kragelund, B. B. *et al.* Hydrophobic core substitutions in calbindin D9k: effects on Ca²⁺ binding and dissociation. *Biochemistry* **37**, 8926-8937, doi:10.1021/bi9726436 (1998).
- 26 Jensen, D. *et al.* The exchanged EF-hands in calmodulin and troponin C chimeras impair the Ca(2)(+)-induced hydrophobicity and alter the interaction with Orai1: a spectroscopic, thermodynamic and kinetic study. *BMC Biochem* **16**, 6, doi:10.1186/s12858-015-0036-7 (2015).
- 27 Nara, M., Morii, H. & Tanokura, M. Infrared study of synthetic peptide analogues of the calcium-binding site III of troponin C: The role of helix F of an EF-hand motif. *Biopolymers* **99**, 342-347, doi:10.1002/bip.22176 (2013).
- 28 Fast, J. *et al.* Symmetrical Stabilization of Bound Ca²⁺ Ions in a Cooperative Pair of EF-Hands through Hydrogen Bonding of Coordinating Water Molecules in Calbindin D9k. *Biochemistry* **40**, 9887-9895, doi:10.1021/bi010551h (2001).
- 29 Kiyota, Y. & Takeda-Shitaka, M. Molecular recognition study on the binding of calcium to calbindin D9k based on 3D reference interaction site model theory. *J Phys Chem B* **118**, 11496-11503, doi:10.1021/jp504822r (2014).
- 30 Linse, S. *et al.* Structure-function relationships in EF-hand calcium-binding proteins. Protein engineering and biophysical studies of calbindin D9k. *Biochemistry* **26**, 6723-6735, doi:10.1021/bi00395a023 (1987).
- 31 Linse, S. *et al.* Electrostatic contributions to the binding of calcium in calbindin D9k. *Biochemistry* **30**, 154-162 (1991).

- 32 Johansson, C., Ullner, M. & Drakenbeg, T. The solution structure of mutant calbindin D9k determined by NMR, show that the calcium-binding site can adopt different folds. *Biochem.* **32**, 8429-8438 (1993).
- 33 Gagne, S. M., Li, M. X., McKay, R. T. & Sykes, B. D. The NMR angle on troponin C. *Biochem Cell Biol* **76**, 302-312 (1998).
- 34 Abdessamad Ababou, R. A. S., y John R. Desjarlais. Long range effects on calcium binding and conformational change in the N-domain of calmodulin. *Biochemistry* **40**, 12719-12726 (2001).
- 35 Gagne, S. M., Tsuda, S., Li, M. X., Smillie, L. B. & Sykes, B. D. Structures of the troponin C regulatory domains in the apo and calcium-saturated states. *Nat Struct Biol* **2**, 784-789 (1995).
- 36 Shaw, G. S. & Sykes, B. D. NMR solution structure of a synthetic troponin C heterodimeric domain. *Biochemistry* **35**, 7429-7438, doi:10.1021/bi9528006 (1996).
- 37 Shaw, G. S., Golden, L. F., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. Interactions between paired calcium-binding sites in proteins: NMR determination of the stoichiometry of calcium binding to a synthetic troponin-C peptide. *J Am Chem Soc* **113**, 5557-5563, doi:10.1021/ja00015a006 (1991).
- 38 Shaw, G. S., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. Stoichiometry of calcium binding to a synthetic heterodimeric troponin-C domain. *Biopolymers* **32**, 391-397, doi:10.1002/bip.360320415 (1992).
- 39 Shaw, G. S., Hodges, R. S. & Sykes, B. D. Determination of the solution structure of a synthetic two-site calcium-binding homodimeric protein domain by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 9572-9580 (1992).
- 40 Monera, O. D. *et al.* Role of interchain alpha-helical hydrophobic interactions in Ca²⁺ affinity, formation, and stability of a two-site domain in troponin C. *Protein Sci* **1**, 945-955, doi:10.1002/pro.5560010713 (1992).
- 41 Osuna, J., Flores, H. & Gaytán, P. A reporter system that discriminates EF-hand-sensor motifs from signal-modulators at the single-motif level. *FEBS Lett.* **586**, 3398-3403 (2012).
- 42 Osuna, J., Flores, H. & Saab-Rincon, G. The beta1 domain of protein G can replace the chorismate mutase domain of the T-protein. *FEBS Lett* **586**, 466-471, doi:10.1016/j.febslet.2012.01.033 (2012).
- 43 Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd edn, (Springer, 2006).
- 44 Someya, Y. & Yui, H. Fluorescence lifetime probe for solvent microviscosity utilizing anilinonaphthalene sulfonate. *Anal Chem* **82**, 5470-5476, doi:10.1021/ac100116j (2010).