



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Construcción de una fusión de proteínas fluorescentes con un fragmento del receptor de estrógeno de humano

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Noé Alejandro Arroyo Mozo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Marcela Ayala Aceves
[Instituto de biotecnología UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Takuya Nishigaki Shimizu
[Instituto de biotecnología UNAM](#)

Dra. Claudia Rodríguez Almazán
[Instituto de biotecnología UNAM](#)

Ciudad de México. Junio, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El siguiente trabajo se realizó en el grupo de Biocatálisis REDOX bajo la asesoría de la Dra. Marcela Ayala Aceves, del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México.

Los estudios de maestría se realizaron con apoyo de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradecimientos:

Al Dr. Takuya Nishigaki por proporcionar los vectores con los genes que codifican a las proteínas fluorescentes.

A la Biol. Rosa Román por el apoyo técnico para la realización de esta tesis.

Agradecimientos personales:

A mi familia

A la Dra. Marcela Ayala

A mis amigos

Al grupo de laboratorio

Resumen

Los perturbadores endócrinos (PE) son sustancias que modifican las funciones normales del sistema endócrino. Los PE con mayor toxicidad, suelen ser aquellos que tienen actividad estrogénica, como son el estradiol (E2), el bisfenol A, los ftalatos, etc. Los posibles efectos adversos de estos compuestos sobre el ambiente y el ser humano a concentraciones muy bajas, han impulsado a la comunidad científica a buscar sistemas sencillos y sensibles que permitan identificar, detectar o encontrar si un compuesto es o no, un PE. Debido a que los PE con actividad estrogénica (PEE) ejercen su efecto a través de su unión al receptor de estrógeno humano (REh), ésta proteína y su dominio de unión a ligando (por sus siglas en inglés LBD, *ligand binding domain*), se han utilizado como moléculas sensoras de PEE. Las características del LBD que han permitido utilizarla como molécula sensora son: 1) El LBD por sí solo es capaz de unirse eficientemente al etinilestradiol (E2) y a los PEE, 2) un amplio número de sustancias pueden unirse al LBD y modificar las vías de señalización del RE, 3) la unión del ligando induce cambios conformacionales y dimerización del LBD, estos fenómenos dependientes de ligando se han utilizado para detectar y diferenciar a PEE. Otros autores han hecho experimentos basados en el fenómeno FRET para determinar las velocidades de dimerización del LBD con diferentes PEE. Siguiendo el mismo principio, se pretende detectar PEE con un sistema FRET basado en la dimerización dependiente de ligando del LBD del RE. Por tal motivo, se fusionó exitosamente en el N-terminal del LBD un par de proteínas fluorescentes, para formar las quimeras de LBD-venus (Qv) y LBD-turquesa2 (Qt), un par FRET CFP-YFP. Aunque las quimeras presentaron fluorescencia al expresarse en cepas de *Escherichia coli* BI21 (DE3), su solubilidad (400 µg/mL) es 25 veces menor que la solubilidad del propio LBD (10 mg/mL).. Además, las quimeras presentaron poca estabilidad, ya que, durante su extracción, así como en su forma pura, las quimeras sufren degradación. Esta degradación produce proteínas de alrededor de 25 kDa, las cuales presentaron fluorescencia con un máximo de emisión que corresponde al de las PF. Estos datos sugieren que la degradación podría estar ocurriendo en el conector ("linker") o en el LBD del RE, pero no en las PFs. La degradación de las quimeras se previene al almacenarlas en amortiguador fosfatos 10 mM con glicerol al 50%. En estas condiciones las quimeras lograron ser estables por más de un mes. Por otro lado, después de diluir la quimera para los experimentos de fluorescencia, las quimeras pierden más del 25% de la intensidad de fluorescencia en 4h. Esta pérdida de fluorescencia no está relacionada con el fotoblanqueo, ya que agentes surfactantes como el tritón x-100 ayudan a mantener la fluorescencia por 4h.

Además, un análisis electroforético sugiere que las quimeras se encuentran como oligómeros. La formación de oligómeros podría ser responsable de una baja sensibilidad de la señal FRET. Por tal motivo, se utilizó urea y/o SDS para disociarlos. La adición de 2 M de urea solo logró disociar parcialmente a los oligómeros, mientras que la adición de 2 M de urea y SDS al 0.1% logró formar un solo estado oligomérico. Sin embargo, en estas condiciones las quimeras pierden intensidad de fluorescencia al pasar el tiempo. Finalmente se encontró que la sola adición de SDS logró formar un solo estado oligomérico, y que, en conjunto con Triton X-100 0.02% la intensidad de fluorescencia se mantiene al pasar el tiempo. Por tal motivo, se usaron estos agentes para hacer las pruebas FRET.

A pesar de la formación de un solo estado oligomérico y la estabilidad de la intensidad de la fluorescencia de las quimeras en amortiguador con Triton X-100 0.02% y SDS al 0.1%, se observa muy poca interacción proteína-proteína entre las quimeras a través del sistema FRET. Esto indica que posiblemente las quimeras no estén heterodimerizando o que el par FRET no es eficiente.

Tabla de Contenido

1	INTRODUCCIÓN	9
1.1	Los perturbadores endócrinos.....	9
1.2	Mecanismos generales de perturbación endócrina	12
1.3	El receptor de estrógeno y sus mecanismos de acción	12
1.4	Los mecanismos de acción del RE.....	15
1.5	Vía genómica	16
1.6	Vía no genómica.....	17
1.7	Técnicas para detectar PE.....	17
1.8	Fluorescencia y proteínas fluorescentes	19
1.9	Transferencia de energía Föster por resonancia (FRET).....	20
1.10	Pares FRET y sus propiedades	22
2	ANTECEDENTES	23
3	JUSTIFICACIÓN	24
4	HIPÓTESIS	25
5	OBJETIVOS	25
6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
7	METODOLOGÍA	27
7.1	Amplificación de los genes que codifican a las proteínas fluorescentes monoméricas mClover, mRuby2, mTurquesa2 y mVenus, y amplificación de la región E del RE y la región EF del RE.....	27
7.2	Ligación al plásmido de clonación; pJET1.2	28
7.3	Fusión de la secuencia codificante para cada una de las proteínas fluorescentes en los plásmidos basados en pET28a(+) que contienen la región E.....	30
7.4	Expresión y purificación de proteínas recombinantes en <i>E coli</i> BL21	32

7.5	Ensayos FRET	33
8	RESULTADOS.....	34
8.1	Construcción de las quimeras.....	34
8.2	<i>Expresión de proteínas en Escherichia coli BI21 (DE3)</i>	39
8.3	<i>Purificación de las quimeras por cromatografía de afinidad Ni-NTA</i>	41
8.4	<i>Purificación de las quimeras con el fragmento fluorescente por intercambio aniónico</i> 44	
8.5	<i>Degradación de las quimeras</i>	45
8.6	Las quimeras podrían formar oligómeros	53
8.7	Estabilidad de la fluorescencia de las quimeras en presencia de agentes caotrópicos 56	
8.8	No hay transferencia de energía Förster por resonancia con 2 M de urea.....	59
8.9	El SDS podría fomentar la dimerización	60
9	CONCLUSIÓN.....	61
10	PERSPECTIVAS	63
11	BIBLIOGRAFÍA	64

Introducción

1.1 Los perturbadores endócrinos

Se les llama perturbadores endócrinos (PE) a las sustancias químicas exógenas que alteran las funciones normales del sistema endócrino. Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que la exposición a PE durante el desarrollo embrionario pueden provocar malformaciones, afectar el desarrollo de los órganos sexuales y reducir la fertilidad en animales de laboratorio (Howdeshell et al. 2007; Gray Jr. et al. 1999; Fernandez et al. 2007). Además, se sospecha que los PE están relacionados con la disminución de la producción de espermatozoides, el aumento de las probabilidades de cáncer testicular, ovario y mama (Soto & Sonnenschein 2010), problemas de obesidad (Heindel et al. 2015), neurológicos (Gore et al. 2015) y la modificación de la impronta génica (Peters 2014).

Los PE están catalogados como contaminantes emergentes, es decir, son sustancias químicas sin medidas regulatorias y cuyos efectos en el ambiente y/o sobre la salud son desconocidos o no han sido previstos, pero que eventualmente podrían tener un impacto sobre la vida silvestre y/o la salud humana (Bolong et al. 2009).

Los PE son ubicuos, tienen tanto un origen natural, como los fitoestrógenos (daidzeína y genisteína), así como un origen sintético, como: el bisfenol A (presente en plásticos y en envases de alimentos), el nonilfenol (es un producto de la degradación de algunos aditivos para plásticos y detergentes), los ftalatos (presentes en algunos plásticos), los retardantes de fuego bromados (presentes en plásticos, textiles, maderas, materiales eléctricos y materiales de construcción) y el estradiol (E2) y sus derivados (presentes en en tabletas

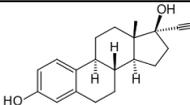
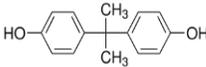
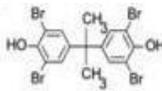
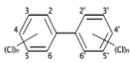
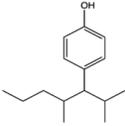
Tabla 1. Concentración de algunos PE en cuerpos de agua

Fuente de Agua	Ubicación	Compuesto	Concentración ng/L
Aguas residuales municipales	UK	Estradiol	7-88
	Japón	Estradiol	2.7-48
	México	Bisfenol A	7177
	México	Estradiol	6.8
Aguas superficiales	Japón	Nonilfenol	250
Agua potable	Alemania	Estradiol	0.4

para prevenir el embarazo), entre otros. Uno de los reservorios más importantes de PE es el agua, ya que son excretados o lavados del cuerpo humano y desechados directamente en fuentes de agua. La presencia de estos compuestos se ha detectado en diferentes cuerpos de agua (ver Tabla 1), debido a que, las plantas de tratamiento de aguas

no logran removerlos completamente, y hasta ahora no se han desarrollado métodos estandarizados para su remoción, además de que no existen normas regulatorias que establezcan los límites máximos permisibles para estos compuestos. Por ejemplo, la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) en Estados Unidos, establece que sólo se realizarán pruebas cuando la concentración de los contaminantes sea mayor a 1 µg/L y la concentración de muchos de los PE están por debajo de ese valor (Bolong et al., 2009; Chávez, Maya, Gibson, & Jiménez, 2011) (Tabla 2).

Tabla 2: Principales perturbadores endócrinos

Nombre	Efectos Negativos	Usos	Estructura	Referencias
Estradiol	Desarrollo de los órganos sexuales, cáncer, enfermedades cardiovasculares, obesidad etc.	Anticonceptivos, terapias hormonales, tratamiento contra el hipoestrogenismo, síntomas contra la menopausia.		(Nghiem et al. 2004)
Ftalatos	Afecta al desarrollo de los órganos sexuales y reducción de la fertilidad	Se utilizan como plastificantes en resinas de PCV, empaques de alimentos, material de cerámica, adhesivos, etc.		(Heudorf et al. 2007; Jurado et al. 2012)
Bisfenol A (BPA)	Problemas cardiovasculares, ovario policístico, síndromes metabólicos, desarrollo de cáncer.	Plásticos policarbonatos, epoxiresinas, envases de alimentos, etc.		(Lapworth et al. 2012; Calafat et al. 2008)
Retardantes de fuego bromados	Sistema tiroideo, reproductivo y neuronal	En plásticos, madera, papel y textiles		(Oros et al. 2005)
Bifenilos policlorados (PCB)	Sistema tiroideo, inmune, reproductivo, neurológico; desarrollo de cáncer.	Fluido dieléctrico en equipos eléctricos industriales, pinturas, plásticos, adhesivos, lubricantes, capacitores, fluidos hidráulicos, etc.		(Ge et al. 2014; Gray Jr. et al. 1999)
Alquilfenoles	Desarrollo de cáncer, actividad antiandrogénica, disminución de la fertilidad.	Detergentes, desinfectantes, pesticidas		(Lapworth et al. 2012)

Destacan algunos PE como ftalatos, alquilfenoles y bisfenoles A, que pueden encontrarse en concentraciones de $\mu\text{g/L}$.

Ya en los cuerpos de agua, los PE pueden ser biodegradados o pueden acumularse en los organismos. Por ejemplo, el E2 se degrada por fotólisis con un $t_{1/2}$ de 29 días en tierra esterilizada y 4h en tierra no esterilizada (Xuan, Blassengale, & Wang, 2008). Sin embargo, puede bioacumularse en capas anaerobias más profundas donde la fotodescomposición y biodegradación es baja (Petrovic, Eljarrat, de Alda, & Barceló, 2003). A pesar de que el porcentaje de remoción del E2 en las plantas de tratamiento de agua supera el 70% (Lapworth et al., 2012), sigue siendo un riesgo debido a la remoción incompleta de estos compuestos, su alta producción industrial y efectos a bajas concentraciones.

Se conocen alrededor de 564 sustancias con posible efecto de PE (Eljarrat, Alda, & Barceló, 2004) y se siguen sintetizando nuevas sustancias cuyos efectos en el ambiente y en el hombre son desconocidos. Por lo que en un futuro se esperan nuevos compuestos con actividad de PE.

Los perturbadores endócrinos más comunes y potentes en el ambiente (Chun, Stuart, Craig, Daniel, & George, 2011) son los compuestos con actividad estrogénica, es decir que modifican las vías de señalización del receptor de estrógeno y/o sus correguladores. En 1980 Purdom et al., encontró que las sustancias estrogénicas provocaban un aumento en la concentración de vitelogenina (un gen reportero que es indicativo de estimulación estrogénica en el hígado) en plasma de peces que vivían río abajo de las centrales de tratamiento de agua, siendo el etinilestradiol (E2) el principal compuesto estrogénico. Se ha observado que concentraciones tan bajas como 1 ng/L de E2 son capaces de aumentar hasta 500 veces la expresión de vitelogenina y concentraciones tan pequeñas como 0.1 ng/L de E2 son capaces de dar una respuesta positiva (Nghiem et al., 2004). Además, concentraciones de 50 ng/L tienen efectos transgeneracionales en la reproducción de los peces (Bhandari, vom Saal, & Tillitt, 2015), lo que demuestra un efecto adverso significativo para las poblaciones de peces que se encuentran río abajo de las centrales tratadoras de aguas residuales. Por ejemplo, en los ríos de EU la concentración promedio de E2 es de 160 ng/L (Nghiem et al., 2004) por lo que se espera un efecto negativo en el ciclo reproductivo de los peces que se encuentren en esos ríos. Además, otros estudios han demostrado que altas concentraciones de hormonas estrogénicas pueden provocar la formación de gónadas hermafroditas (ovotestis) en peces, lo que puede llegar a reducir el potencial reproductivo de los peces hasta en un 76 % (Sumpter & Jobling, 2013). También

se ha observado el efecto aditivo de las concentraciones de PE con actividad estrogénica (Brian et al., 2005). Recientemente, se demostró también el efecto de la dieta en la susceptibilidad de ratones de la primera generación a presentar cáncer de mama debido al consumo por parte de sus progenitoras de bisfenol A, a concentraciones de 2.5 µg/ Kg de peso corporal/ día de bisfenol A, que es 20 veces menor a la dosis oral tolerable de referencia diaria para humanos. (Leung et al., 2017).

1.2 Mecanismos generales de perturbación endócrina

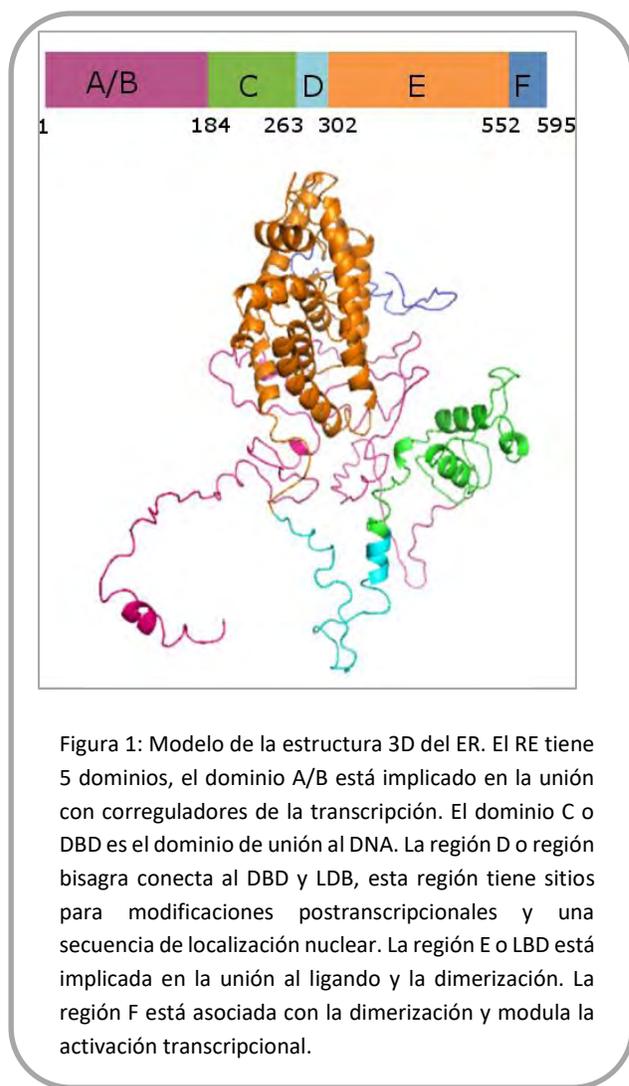
Se conocen varios mecanismos por los cuales los PE podrían ejercer su efecto: a) degradación de receptores hormonales: algunos PE como nonilfenol y PCBs activan al receptor aril hidrocarburo (AhR) induciendo la ubiquitinación de los receptores hormonales y por tanto su degradación; b) competencia por coactivadores, por ejemplo la dioxina (2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) activa al AhR y recluta al translocador nuclear del receptor aril hidrocarburo (ARNT), también activador del RE, inhibiendo por competencia su actividad; c) inhibición de la transcripción: el PE 3-metilcolantreno se une al ARNT provocando la unión del ARNT a un sitio llamado XRE, un sitio adyacente al sitio de unión del DNA del RE, inhibiendo así la actividad transcripcional del RE; D) modificación del metabolismo de la biosíntesis de hormonas por la inhibición del transporte hormonal al tejido blanco, modificación de los niveles de las proteínas de unión a hormonas (albúmina y glicoproteínas de transporte) y la alteración del catabolismo hormonal. Como por ejemplo: la inhibición de CYP19B, una enzima P450 encargada de la síntesis de estradiol a partir de testosterona (Swedenborg et al. 2009). También se han propuesto que algunos PE pueden dañar directamente al DNA, provocar modificaciones epigenéticas (impronta génica) e inhibir la sinapsis (Elobeid & Allison 2008).

1.3 El receptor de estrógeno y sus mecanismos de acción

Los PE con actividad estrogénica pueden realizar su efecto al interactuar con las variantes (α y β) del RE y generar una respuesta por uno o más de los mecanismos de acción del RE. En los seres humanos, los RE α y β son codificados por los genes *esr1* y *esr2*, respectivamente. A pesar de tener características estructurales similares, cada receptor tiene funciones especializadas.

El RE α (Figura 1) tiene 595 aminoácidos (AA) mientras que el RE β tiene 530 aminoácidos. La región A/B de los receptores de estrógeno es la más variable, comparten menos del 20% de identidad en aminoácidos, y se cree que esa región contribuye principalmente a su

diferenciación funcional. La región A/B, carece de estructura definida y contiene a la función de activación 1 (AF1 por sus siglas en inglés, *activation function 1*). Esta región tiene múltiples sitios de fosforilación que son responsables de la regulación transcripcional del RE (Ascenzi et al. 2006). Además, participa en la modulación de la transcripción al interactuar con coactivadores y correpresores.



La región C que comprende al dominio de unión a DNA (DBD por sus siglas en inglés, *DNA binding domain*) es la región más conservada entre las variantes, que tienen un 95% de identidad en aminoácidos, y está formado por dos hélices α perpendiculares que forman un núcleo hidrófobo, y dos sub-dominios llamados caja P y D. El primero está implicado en la unión al DNA en sitios específicos llamados elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y el segundo está implicado en la dimerización. La región D, también llamada región bisagra, conecta al DBD con el dominio de unión a ligando (LBD por sus siglas en inglés *Ligand Binding Domain*). Entre el RE α y β se comparte una identidad del 30%. La RB contiene sitios para modificaciones postraduccionales y una secuencia de localización nuclear (K257-K303) (Casa

et al. 2015). La región E o el LBD de las variantes tienen un 55% de identidad en aminoácidos. El LBD está implicado en la unión al ligando, la dimerización y la activación transcripcional (Tamrazi et al. 2002). Estructuralmente los LBD's de ambas proteínas son muy similares; sin embargo, difieren en dos aminoácidos en la cavidad de unión a ligando (LBP, por sus siglas en inglés *Ligand Binding Pocket*) y, además, la cavidad del RE β es 20% más pequeña que en el RE α . El LBD del RE α es una región altamente conservada que consta de 12 hélices alfa y dos hélices β antiparalelas, con una conformación de

sándwich de tres capas que genera un núcleo altamente hidrófobo. La región de interacción proteína-proteína se conforma de las hélices H3, H4 y H12, las cuales generan un surco que interacciona con un motivo helicoidal LxxLL en los correguladores. La hélice 12 del LBD es altamente dinámica y su conformación depende del ligando, esta variedad de conformaciones permite la unión de diferentes correguladores y la interacción/activación de diversos factores transcripcionales. La interface de dimerización está principalmente dominada por los motivos 8 (M420 a M436) y 11 (E496 a K527), pero también participan aminoácidos de las hélices H9 y H10 (Tanenbaum et al. 1998). Esta región corresponde al 15% de la superficie del LBD (Brzozowski et al. 1997). El sitio de unión a ligando está compuesto por residuos de los motivos H3, H6, H8, H11 Y H12 (Ascenzi et al. 2006). Entre el LBD y la región F se encuentra la región de activación 2 (AF2 por sus siglas en inglés, *activation function 2*) que es esencial para la actividad transcripcional y unión a coactivadores en presencia de ligando (Hall et al. 2001). La región F de las dos proteínas tiene una similitud menor al 20% (Zhao et al. 2008). Esta región está asociada a la dimerización y a la modulación de la activación de la transcripción (Björnström & Sjöberg 2005).

Los receptores de estrógeno tienen dos funciones de activación (AF, *activation function* por sus siglas en inglés). La región AF1 se activa de forma independiente de ligando a través de fosforilación vía MAP quinasas, activadas por factores de crecimiento (Shiau et al. 1998), mientras que AF2 se activa en presencia de ligando. Se sabe que el RE β tiene un dominio AF1 poco sensible a la activación independiente de ligando, en comparación con el RE α , por lo que depende del dominio AF2 para su activación, es decir su actividad depende principalmente del ligando. El RE α tiene una región AF1 sensible a la activación independiente de ligando, por lo que presenta varios sitios de fosforilación, entre las más importantes son S118m S167, es decir que la fosforilación juega un papel importante en la activación del RE α . La fosforilación del RE está relacionada con la localización intracelular, la regulación de la afinidad por el DNA y por el ligando, la interacción con proteínas y cromatina, la estabilidad de la proteína, el nivel de transcripción y la dimerización. Por otro lado, el RE β tiene una región que permite regular la actividad del RE α (Hall & McDonnell 1999).

Los RE α y β tienen actividades similares *in vitro*, interactúan con ERE idénticos y siguen los mismos pasos en la vía de señalización. *In vivo*, según el tejido o tipo celular, los RE se encuentran en diferentes cantidades, en diferentes isoformas y en diferentes estados de fosforilación. Debido a esto, el mismo ligando unido al mismo receptor en diferentes tejidos

o tipos celulares pueden producir diferentes respuestas. También el mismo ligando puede provocar la activación de la transcripción en un tejido y en otro inhibir la transcripción (Kuiper et al. 1997; Paech et al. 1997).

Dependiendo de las modificaciones postraduccionales los RE se encuentran entre el núcleo y el citosol o en la membrana celular. Dentro del núcleo los RE se encuentran en forma de dímeros o asociados con otros factores transcripcionales, mientras que en el citosol se encuentran asociados a un complejo de chaperonas. Es en la secuencia de localización nuclear donde se unen a proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*), las cuales reclutan a chaperonas que ayudan al buen plegamiento del RE y permiten que sea sensible al ligando. La unión del ligando promueve la disociación del complejo y la unión de proteínas reguladoras (Tao & Zheng 2011).

1.4 Los mecanismos de acción del RE

Los vertebrados usan la vía de señalización del receptor de estrógenos (ver Figura 2) para regular la expresión de genes en presencia de hormonas esteroideas. La señal de activación comienza con la unión del ligando natural, 17 β -estradiol, con el RE. El estradiol no es el único compuesto que puede activar al RE, éste también tiene afinidad por otros compuestos debido a que su sitio de unión a ligando (LBP, por sus siglas en inglés *Ligand Binding Pocket*) es relativamente grande (Shanle & Xu 2011) por lo que compuestos como el etinilestradiol, bisfenol A y genisteína, entre otros, son capaces de activarlo.

El RE puede unirse a reguladores de la transcripción (Mérot et al. 2004). Los coactivadores son una serie de proteínas que se unen al dímero del receptor de estrógeno y promueven la modificación de histonas (Métivier et al. 2003), lo que permite establecer la unión entre el aparato basal de la transcripción y el receptor de estrógeno (Kushner et al. 2000), mientras que los correpresores promueven la desacetilación de histonas e inhiben la transcripción (McDowal 2004).

Hay dos tipos de mecanismos de acción mediados por el RE: 1) el dímero del RE y/o el RE con corre reguladores se une al (elemento del respuesta del estrógeno) ERE (vía genómica) para activar o inhibir la transcripción del gen blanco, 2) la activación del RE induce la activación de segundos mensajeros o factores transcripcionales (por ejemplo, el AhR y la hormona de crecimiento) (vías no genómicas) para regular la expresión de genes (Gray Jr. et al. 1999).

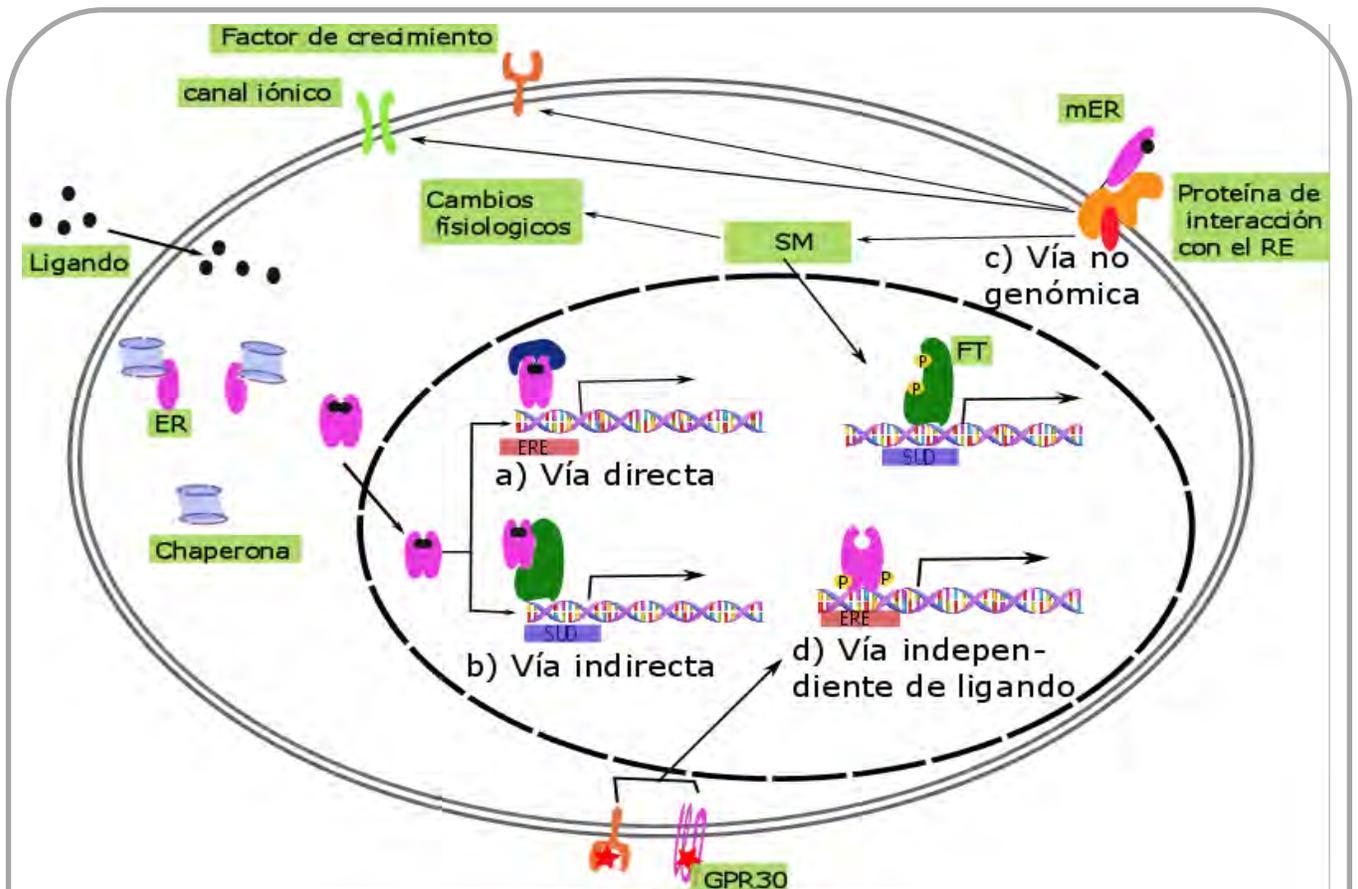


Figura 2. Esquema de los modelos de los mecanismos de acción del Receptor de estrógeno (ER). a) Vía directa: El RE se encuentra asociado a una chaperona en el citosol, cuando se une al ligando, se libera la chaperona y da lugar la dimerización. El dímero entra al núcleo donde se une directamente al elemento de respuesta al estrógeno. Coactivadores y correpresores modulan la actividad transcripcional. b) El dímero de ER puede activar a otros factores transcripcionales como SCR1 y reconocer a sitios de unión a DNA (SUD) diferentes al ERE y así iniciar la transcripción. c) el ligando puede activar al receptor de estrógeno membranar (mRE) u otros receptores y tener un efecto en el factor de crecimiento o canales iónicos, o a través de una proteína de interacción con el ER, y sintetizar segundos mensajeros que pueden activar la transcripción al fosforilar a factores transcripcionales (FT) y/o provocar cambios fisiológicos rápidos. d) la activación del factor de crecimiento y la proteína G acoplada al RE pueden activar vía fosforilación al RE y activar la transcripción en sitios ERE.

1.5 Vía genómica

Se han descrito tres modelos de activación por la vía genómica:

a) Directa: Al unirse el ligando al RE (citosólico o nuclear) se promueve un cambio conformacional que permite la dimerización y la unión del dímero al sitio ERE. El RE citosólico se encuentra asociado a chaperonas en ausencia de ligando. La unión del ligando induce un cambio conformacional que provoca la separación del complejo ER-chaperona y

permite la formación del dímero, el cual se transloca al núcleo (Jiang et al. 1995; Nadal et al. 2001) y se une al sitio ERE.

b) Indirecta: una vez unido el ligando al RE, éste se asocia a proteínas reguladoras, como SCR1, y se unen a factores transcripcionales que reconocen a sitios de unión diferentes del ERE.

c) Independiente de ligando: los RE y los factores de crecimiento presentan diafonía o “*interferencia*” y son dependientes uno del otro (Hall et al. 2001). Los factores de crecimiento pueden activar o inhibir al RE a través de cascadas de señalización dependientes de quinasas como PI3K, AKT/PKB, ERK1,2, JNK, p38-MAPKs entre otras (Osborne & Schiff 2003). Estas vías de señalización también pueden fosforilar a los correguladores y potenciar su función (Hall et al. 2001).

1.6 Vía no genómica

La vía no genómica es característica de las hormonas esteroideas. Son vías de señalización rápidas y que involucran cascadas de proteínas quinasas o producción de óxido nítrico (NO) a través de la movilización intracelular de calcio, activación de la adenilato ciclasa, activación de la vía MAPK y/o PI3K. Una de las funciones de la vía no genómica es la de activar o disminuir la transcripción, es decir las vías no genómicas pueden regular la actividad de las vías genómicas (Björnström & Sjöberg 2005).

1.7 Técnicas para detectar PE

La técnica estándar para detectar los PE involucra la extracción en fase sólida (EFS) de la muestra, seguida de un análisis por cromatografía de líquido acoplada a sistemas de detección con espectrómetros de UV, de fluorescencia o masas. Recientemente se han diseñado métodos multicompuestos de gran sensibilidad que utilizan cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem, siendo estos métodos los más utilizados. La desventaja de estos métodos es que se necesita de equipo costoso y personal calificado, la derivatización de compuestos con pérdida de los mismos y rendimientos de extracción variables.

Debido a los efectos negativos que podrían tener los PE, se han diseñado diversos métodos, basados en organismos completos, bioensayos celulares y ensayos moleculares (Chang et al. 2009), como los que se presentan en la Tabla 3 .

Tabla 3. Resumen de métodos de detección de PE basados en biosistemas

Método	LD (ng/L)
Ensayos de vitelogenina en peces, anfibios y aves	0.1 (en peces)
E-Screen	0.27
YES	0.3-30
Elisa	20-40
Resonancia por plasmones superficiales (SRP)	1.4
FRET	1

En los ensayos basados en organismos completos se obtienen datos como supervivencia, crecimiento, desarrollo de caracteres secundarios, fecundidad, viabilidad del gameto, histología y/o la producción de ciertas proteínas. Los mecanismos de acción de los PE se pueden dilucidar al estimar, por ejemplo, los cambios

en las concentraciones de vitelogenina, un gen reportero de actividad estrogénica en hígado, los efectos en los caracteres sexuales secundarios y la histología de los órganos afectados. Los efectos adversos en las poblaciones pueden ser predichos por las tasas de supervivencia, crecimiento, reproducción y relación hembra/macho (Soares et al. 2008). La ventaja de estos métodos es que pueden cuantificar los efectos biológicos y el efecto de exposiciones prolongadas de un PE o mezclas de PE. Su desventaja es que no todos los organismos responden igual al mismo PE, consumen mucho tiempo, son caros, requieren equipo y personal especializado, los errores de medición se incrementan por la complejidad del sistema y por razones éticas su uso ha disminuido.

Los bioensayos celulares utilizan un sistema de expresión basado en la activación por los PE de genes reporteros, como la luciferasa o la β -galactosidasa. Las ventajas de estos métodos es que suelen ser más rápidos y baratos que los ensayos *in vivo*, son muy sensibles y no necesitan equipo especial. Sin embargo, no proveen respuestas robustas con muestras ambientales complejas (Chang et al. 2009), las muestras pueden ser tóxicas, subestiman los efectos estrogénicos y requieren concentrar la mezcla (Soares et al. 2008).

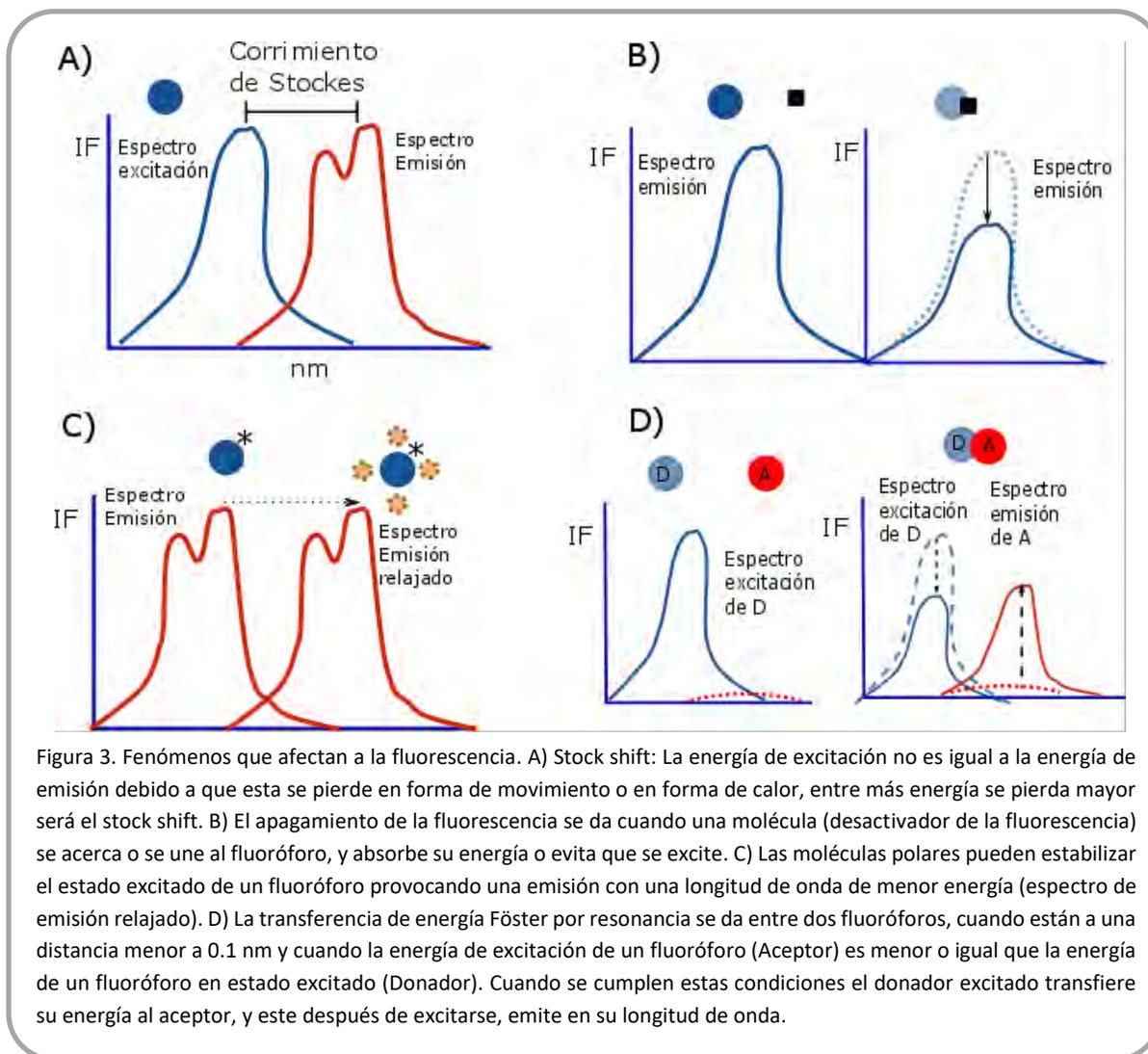
En los ensayos moleculares se utiliza un elemento de reconocimiento biológico que se une al o los PE y que una vez unido provoca una señal o efecto que puede ser cuantificado. En estos ensayos se puede utilizar la muestra ambiental directa y, en pequeñas cantidades, suelen ser sensibles, precisos y exactos (Chang et al. 2009). Sin embargo, estos métodos no muestran el efecto biológico de los PE.

Los ensayos moleculares basados en los receptores nucleares (RN), como el receptor de andrógenos y el receptor de estrógenos, tienen la ventaja de que no son tan específicos como los anticuerpos, ya que estos solo servirían para detectar uno o muy pocos PE, mientras que los RN serían activados por todos aquellos PE que tengan una afinidad por el RN. Gracias a la versatilidad de los RN se han diseñado numerosos métodos basados en

el receptor de estrógenos para detectar PE con actividad estrogénica. En general, se basan en ensayos de competencia entre el estrógeno y los PE (Usami et al. 2002; Gurer-Orhan et al. 2005), cuantificación de la señal por cambios conformacionales inducidos por los PE (Dumbrepatil et al. 2010), dimerización del ER, unión al ERE (Habauzit et al. 2008) y reclutamiento de factores transcripcionales (Fechner et al. 2009).

1.8 Fluorescencia y proteínas fluorescentes

La fluorescencia es la emisión de luz por una sustancia en un estado electrónico excitado, con una duración cercana a los 10 ns. Las sustancias fluorescentes (fluoróforos) suelen ser moléculas aromáticas que poseen enlaces π conjugados y que tienen poca libertad de movimiento. Las propiedades fluorescentes del fluoróforo son dependientes de los fenómenos que ocurran durante su estado excitado ver (Figura 3): a) La pérdida de energía debida al movimiento o en forma de calor da como resultado una emisión de menor energía



con respecto a la energía de excitación, a este fenómeno se le llama corrimiento de Stokes (*Stokes shift*) (Figura 3A). b) Las moléculas polares pueden estabilizar el estado excitado de un fluoróforo provocando una emisión con una longitud de onda de menor energía (efecto del solvente), es decir se presenta un corrimiento hacia el infrarrojo. c) Si el nivel de energía de excitación de una molécula A (aceptora) es menor o igual al nivel de energía de un fluoróforo en el estado excitado D (donadora), entonces el fluoróforo D puede transferir su energía a la molécula A si colisionan (apagamiento) o se acercan lo suficiente. A este fenómeno se le llama transferencia de energía Förster por resonancia (FRET, *Förster Resonance Energy Transfer* por sus siglas en inglés) (Lakowicz 2006).

Las proteínas fluorescentes se han usado en una gran variedad de experimentos desde que se demostró su utilidad como un marcador codificado genéticamente. Esta característica ha permitido ver estructuras y procesos dentro de las células vivas. Las proteínas fluorescentes (PF) y las cromoproteínas de la familia de las proteínas verdes fluorescentes (GFP por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Proteins*) consisten en 220-240 aminoácidos que se pliegan formando una estructura en forma de barril con 11 hebras β y una hélice distorsionada interna. El grupo cromóforo se encuentra en la hélice distorsionada y se forma por la autocatálisis asistida por oxígeno de tres aminoácidos, que en la GFP de *Aequorea victoria* y sus mutantes, son los aminoácidos en las posiciones 65-67, el aminoácido de la posición 65 puede variar mientras que la Y66 y G67 están conservadas en las PF. Los residuos de las hebras 7, 8 y 10 y, en especial, los residuos S148, N165, K167 y S203 intervienen en las propiedades fluorescentes de grupo fluoróforo, como son: su estado de protonación, polarización, conformación espacial y libertad rotacional. Por otro lado, debido a que su estructura es estabilizada por múltiples interacciones no covalentes, las proteínas fluorescentes son altamente estables a la desnaturalización térmica y química. Casi todas las PF tienen tendencia a formar oligómeros a altas concentraciones debido a que tienen en su superficie aminoácidos capaces de formar puentes salinos y de hidrógeno. Además, algunas PF tienden a formar interacciones fuertes entre sus C-terminales (Tsien 1998; Chudakov et al. 2010)

1.9 Transferencia de energía Förster por resonancia (FRET)

FRET es un proceso en el cual la energía de un fluoróforo (donador) en un estado electrónico excitado transfiere energía de una forma no-radiante, al acoplarse (vía interacciones dipolo-dipolo de largo alcance) con un cromóforo (aceptor) a través de interacciones electroestáticas (Wang & Herman 1996). La velocidad de transferencia de

energía k_t disminuye al aumentar la separación entre el aceptor y el donador (r^{-6}) dentro de un rango de 1-10nm. A menores distancias se dan otros procesos de transferencia de energía (Clegg 1996).

$$k_t = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R}{R_0} \right)^6$$

Donde t es el tiempo de vida de la fluorescencia del donador, R es la distancia entre el donador y el aceptor. R_0 se denomina distancia de Förster, y es la distancia donde la eficiencia FRET es del 50%, para distancias menores que R_0 , la eficiencia FRET (E) es cercana a la máxima y, cuando la distancia es mayor que R_0 , la eficiencia es muy cercana a 0.

Los ensayos basados en la transferencia de energía Förster por resonancia (FRET) suelen tener una sensibilidad menor a μM , los experimentos suelen ser rápidos y los fluorímetros son relativamente baratos, además de que existen fluorímetros de campo.

Principalmente se utiliza FRET en dos tipos de experimentos: el diseño de biosensores intramoleculares, los cuales, que a pesar de tener éxito, han reportado sólo un cambio pequeño en la señal FRET que sólo sobrepasa el ruido de los sistemas de medición (Piston & Kremers 2007). Esto puede estar relacionado a que no se toman en cuenta variables como la distancia Förster, la orientación y la distancia efectiva entre los pares FRET, y a que el diseño generalmente es de prueba y error (Aoki et al. 2012). El otro tipo de diseños es el FRET intermolecular que se utiliza para medir interacciones proteína-proteína, este proceso es más complejo en sistemas *in vivo*, pero los experimentos son factibles. En estos experimentos, la estequiometría juega un papel muy importante.

Otros factores que afectan al FRET son: a) las proteínas fluorescentes tienen espectros de emisión/absorción amplios, lo que provoca *interferencia*, que es cuando el aceptor puede excitarse directamente con la luz que es elegida para excitar al donador y/o cuando el donador emite dentro del espectro de emisión del aceptor; b) La *interferencia* tiene consecuencias en la estequiometría, relaciones estequiométricas donador/aceptor fuera del rango 10:1 y 1:10 presentan *interferencia* más intensa, ya que hay más proteínas fluorescentes que no intervienen en la FRET pero que logran excitarse y emitir; c) El brillo es importante porque permite diferenciar la fluorescencia de una PF de la autofluorescencia del medio (Shaner et al. 2005). Debido a los factores que afectan la eficiencia de FRET,

esta determinación suele ser una medida cualitativa o simplemente “FRET o no FRET” (C Berney & Danuser 2003).

1.10 Pares FRET y sus propiedades

Los pares FRET más populares son PF cian-PF amarillas, una de las ventajas de estos pares es que los donadores tienen altos rendimientos cuánticos, mientras que las PF amarillas son tolerantes a cloruros y tienen tiempos de maduración rápidos. Sin embargo, las PF amarillas sufren de fotoblanqueo, fotoconversión y sobre todo diafonía o superposición de los espectros de emisión entre donador y aceptor. Los pares FRET PF verdes-PF rojas tienen la ventaja de tener menor diafonía, aunque suelen ser menos brillantes. Las proteínas fluorescentes usadas como par FRET como la CFP y YFP tienen un rango dinámico corto, presentan fototoxicidad y fotoconversión y en ocasiones suelen dimerizar (Bryce T Bajar et al. 2016). Se ha reportado el desarrollo de nuevas proteínas fluorescentes, tales como los pares Clover monomérica (mClover) y Ruby2 monomérica (mRuby2), los cuales presentan ciertas ventajas como una menor tendencia a dimerizar y un mayor rango dinámico, es decir alcanzan una mayor eficiencia de FRET en una distancia más grande, y son más brillantes que los pares FRET clásicos de PF verdes y PF rojas (Bryce T. Bajar et al. 2016).

Para diseñar un sistema FRET efectivo se deben considerar algunos aspectos para la elección de las proteínas fluorescentes, como son: que las proteínas fluorescentes se deben expresar bien y que no sean tóxicas para el huésped y que sean suficientemente brillantes para superar la señal de la autofluorescencia del medio o del huésped. Las PF deben ser fotoestables, no deben oligomerizar, deben ser estables en las condiciones del experimento y, por último, debe reducirse la diafonía o “*interferencia*” (Shaner et al. 2005).

2 Antecedentes

En la literatura se encuentran pocos reportes de construcciones con RE y proteínas fluorescentes que pudieran funcionar como biosensores. Por ejemplo, Drumbrepatil et al. en el 2010 diseñaron un biosensor para perturbadores endocrinos (PE) basado en el movimiento (dependiente de ligando) de la hélice 12 del LBD del RE; el movimiento aproxima a proteínas fluorescentes fusionadas en el extremo carboxilo (YFP) y en el extremo amino (CFP) del LBD, generando una señal FRET intramolecular cuando se une a un ligando. El límite de detección del biosensor, para resveratrol, fue de aproximadamente 20 ng/L. Si se toma en cuenta que la afinidad del RE por el resveratrol es miles de veces menor que por el etinilestradiol (E2), este biosensor sería muy sensible para detectarlo. El límite de detección para E2 es de alrededor de 0.5 pg/L con el método de detección HPLC-MS-MS (Keski-Rahkonen et al. 2015) lo que sugiere que una prueba FRET basada en el RE como molécula sensora puede generar un biosensor suficientemente sensible. La desventaja de este sensor es la baja intensidad FRET que presenta. Los autores demostraron que el anclaje de la quimera a nanopartículas de oro mejora la intensidad FRET. No obstante, la señal FRET sigue siendo baja. Otro inconveniente de este sensor es que la señal FRET se estabiliza después de 7 h aproximadamente. En este tipo de sensores no se ha evaluado el desempeño en mezclas de PE. En resumen, aunque se demostró que esta estrategia funciona, todavía se podría mejorar la intensidad de FRET y el tiempo de respuesta, pensando en una posible aplicación en campo y con muestras ambientales.

Por otro lado, Tamrazi *et. al.* (2002) utilizaron un diseño basado en FRET intermolecular, para determinar la cinética de disociación *in vitro* del RE dimérico. En este trabajo el monómero marcado químicamente con 5-iodoaceamidofluoresceína (donador) se mezcla con otro monómero marcado con tetrametilrodamida-5-maleimida (aceptor); al mezclarlos en presencia del ligando se monitorea la señal FRET. Los autores encontraron que en ausencia del ligando el RE dimerizaba dando lugar a una señal FRET basal; se utilizó urea 2 M para reducir la dimerización. Puesto que el objetivo de ese trabajo no era utilizar el sistema como sensor, no se menciona cuál es la eficiencia del par FRET que utilizan ni el límite de detección; el tiempo de incubación con el ligando fue de 5 a 8 h. Sin embargo, este trabajo es un antecedente importante puesto que sugiere que es posible obtener un sistema de detección de PE a través de FRET y basado en la dimerización de RE marcados.

3 Justificación

Los perturbadores endócrinos (PE) son contaminantes que, a pesar de encontrarse en la naturaleza a bajas concentraciones, tienen efectos negativos y a largo plazo sobre la salud de las poblaciones de diferentes organismos acuáticos y eventualmente, de los humanos. Aunque hay varias técnicas para detectar a los PE, estas incluyen varios pasos, extensa manipulación de la muestra, experimentos *in vivo*, entre otros. En nuestro laboratorio estudiamos la transformación enzimática de algunos PE. Con el fin de examinar el cambio de su potencial estrogénico, requerimos una prueba sencilla, reproducible y sensible. Un sistema basado en la dimerización del LBD del receptor de estrógeno en presencia de PE permitiría predecir con una prueba *in vitro* el potencial de un compuesto determinado, o bien sus derivados o mezclas de compuestos de ser PE. Dicho potencial estrogénico podría ser corroborado con otras pruebas, como las mencionadas antes, en sistemas *in vivo*.

De acuerdo con la literatura, existen sistemas basados en FRET (intra- e inter-molecular) que utilizan como molécula el dominio de unión a ligando (LBD) del receptor de estrógeno, el cual sufre cambios estructurales y dimerización al unirse al ligando. Sin embargo, dichos sistemas presentan varios inconvenientes; por ejemplo, una baja intensidad de la señal FRET, dimerización basal del dominio de unión a ligando y largos tiempos de respuesta. En este proyecto se propuso construir un biosensor basado en el LBD del receptor de estrógeno humano, siguiendo estrategias que permitan eliminar o minimizar algunos de estos inconvenientes. Este tipo de sistemas tendría inclusive la ventaja de ser portátil y utilizarse en pruebas de campo, gracias a la existencia de fluorímetros portátiles.

4 Hipótesis

La fusión entre el dominio de unión a ligando del RE y proteínas fluorescentes permitirá obtener un sistema suficientemente sensible y sin dimerización basal, que podría utilizarse como un biosensor para detectar compuestos con potencial de PE

5 Objetivos

Generar una fusión entre el dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos y una selección particular de proteínas fluorescentes, para estudiar su capacidad de generar FRET al dimerizar las quimeras en presencia del ligando.

Objetivos particulares

- Obtener las construcciones entre la región del LBD-RE y cuatro proteínas fluorescentes:
 - mVenus-LBD (Qv)
 - mTurquesa2-LBD (Qt)
 - mClover-LBD (Qc)
 - mRuby2-LBD (Qr)
- Expresar en la cepa de *E coli BL21* y purificar las quimeras
- Analizar el estado oligomérico de las quimeras y su estabilidad (Qv-Qt)
- Evaluar el FRET basal y la respuesta de sistema FRET ante el ligando natural (Qv-Qt)

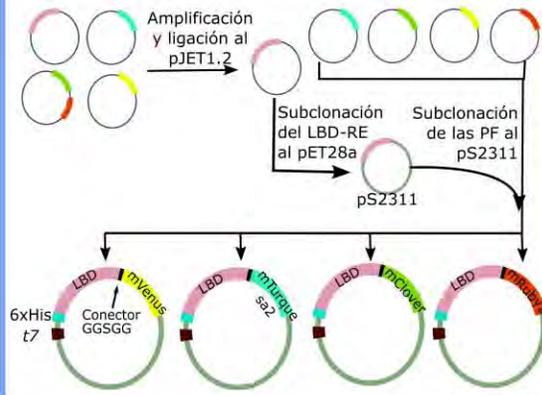
6 Estrategia experimental

Uno de los mecanismos de perturbación estrogénica es la unión del perturbador al receptor de estrógeno, esta unión provoca la dimerización del RE. Basándonos en este principio se pretende obtener un sensor FRET intermolecular que depende de la heterodimerización dependiente de ligando de 2 quimeras basadas en el LBD-RE y un par FRET de PF. Para obtener un sensor eficiente las PF se unieron a través de un conector flexible que permitirá la correcta proximidad y orientación del par FRET. Además, las PF se unirán en el N-terminal del LBD para evitar cualquier efecto en el C-terminal, relacionado con la unión del ligando. Por otro lado, el LBD, *in vitro*, se encuentra como dímero por lo que las quimeras podrían encontrarse también como dímeros. Ya que se busca que en ausencia de ligando las quimeras sean monoméricas, se pretende utilizar agentes caotrópicos para mantener a las quimeras monoméricas y que solo formen dímeros en presencia del ligando. Tomando

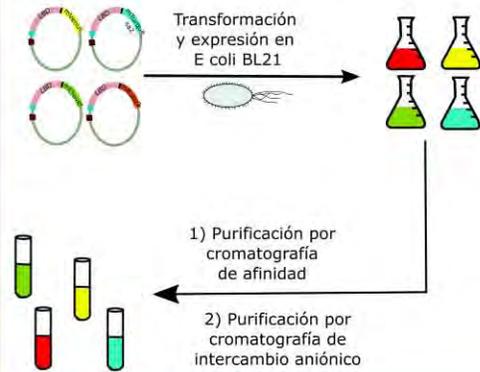
en cuenta todas estas condiciones se espera que se obtenga un sensor sencillo, sensible y robusto.

Estrategia Experimental

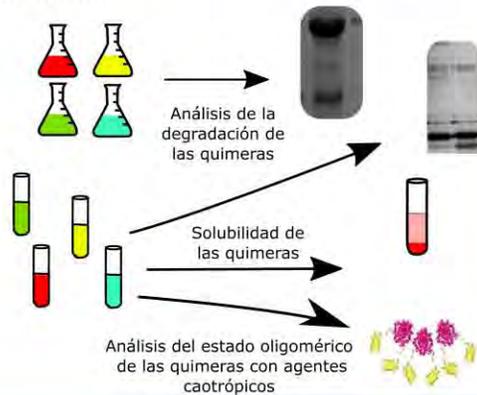
Construcción de fusiones



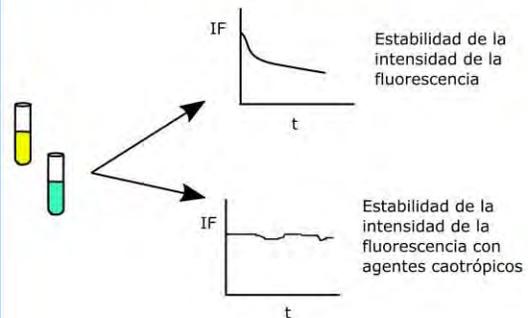
Expresión y purificación de las quimeras



Caracterización de la estabilidad de las quimeras

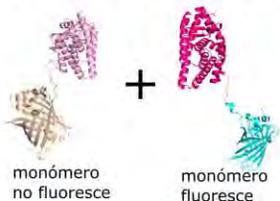


Estabilidad de la fluorescencia



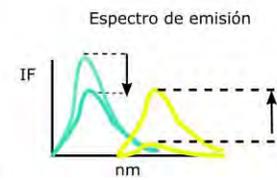
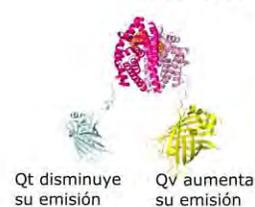
Ensayos FRET

Excitación a 434 nm



Estradiol

Emisión a 474 y 525 nm



7 Metodología

7.1 Amplificación de los genes que codifican a las proteínas fluorescentes monoméricas mClover, mRuby2, mTurquesa2 y mVenus, y amplificación de la región E del RE y la región EF del RE

En la Tabla 4 se muestran los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar a los genes de las proteínas fluorescentes y la región E del RE. Los genes de mClover, mTurquesa2 y mVenus fueron amplificados de los plásmidos donados amablemente por el Dr. Takuya Nishigaki; pCDNA clover-ruby2, pRSET turquesa2 y pRSET venus con los oligonucleótidos Tak 190 y N7, mientras que el gen de la proteína mRuby2 se amplificó con los oligonucleótidos Tak141 y N7, después de digerir con KpnI el plásmido pCDNA clover-ruby. La región E (LBD) se amplificó del plásmido pCDNA-HA-ER Wt (addgene) con los oligonucleótidos N3 y N4. Las reacciones se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Tm (° C)	ΔG Hairpin (kcal/mol)	ΔG Self-dimer (kcal/mol)
N3 (Sacl)	GAG CTC AAG AAC AGC CTG GCC TTG TCC	75	-0.9	-9.4
N4 (XhoI)	CTC GAG TTA GGG CGC ATG TAG GCG GTG GGC GTC C	86	-2.55	-9.9
Tak141 (NheI)	GCT AGC ATG GTG AGC AAG GGC GAG C	77	-0.54	-9.6
Tak190 (NdeI)	CATATG GTG AGC AAG GGC GAG C	71	No tiene	-10.44
N7 (Sacl)	GAGCTCTCCACCGGATCCACCACGAATTCCT TGTACAGCTCGTCCATGCCGAG	95	-3.68	-10.7

de amplificación y concentraciones de reactivos (ver Tablas 5 y 6).

Las condiciones y concentraciones de los reactivos se muestran en las Tablas 5 y 6

Tabla 5. Reactivos para PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen (μ L) para 50 μ L
DNA	100 ng/ μ L	2 ng/ μ L	1
PCR Buffer	10x	1x	5
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	3
dNTPs	2 mM	200 μ M	5
Oligos Fw	3 μ M	200 nM	3
Oligo Rv	3 μ M	200 nM	3
dH ₂ O	-	-	a 50
DNA polimerasa	1 U/ μ L	1 U / 50 μ L	1

Tabla 6. Protocolo de PCR Touchdown

Fase 1	Pasos	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización	95 °C	5 min
2	Desnaturalización	95 °C	30 s
3	Alineamiento	68 °C	45 s
4	Elongación	72 °C	60 s
Repetir los pasos 2-4 10 veces, disminuyendo en cada ronda un grado centígrado			
Fase 2	Pasos	Temperatura	Tiempo
5	Desnaturalización	95 °C	30 s
6	Alineamiento	55 °C	45 s
7	Elongación	72 °C	60 s
Repetir los pasos 5-7 20 veces			
Terminación	Pasos	Temperatura	Tiempo
8	Elongación	72 °C	5 min
9	Espera	4 °C	Hasta retirar

7.2 Ligación al plásmido de clonación; pJET1.2

De cada muestra de PCR se tomaron 0.5 µL y se colocaron en un tubo Eppendorf de 600 µL. A continuación, se adicionaron 0.5 µL de plásmido con extremos romos pJET1.2, 5 µL de amortiguador 2x pJET1.2, 3.5 µL de agua tetradestilada y 0.5 µL de T4 DNA ligasa (Fermentas). La mezcla de reacción se incubó por 20 minutos a 22 °C. Se eliminó la enzima con la adición de 10 µL de cloroformo seguido de agitación en vortex y centrifugación a 1200 rpm por 3 minutos. Se extrajo el producto de ligación (fase superior). Se tomaron 2 µL de producto de ligación y se adicionó a 50 µL de células de *Escherichia coli* DH5α electrocompetentes. Se tomaron 51 µL de células bacterianas más la reacción de ligación y se colocaron en una cubeta de electroporación de 0.1 mm. A continuación, se aplicó un voltaje de 1.8 kV en un equipo de electroporación (Bio-rad). Rápidamente se adicionaron 500 µL de medio LB líquido a las células transformadas. Se tomaron 500 µL de células transformantes, se colocaron en un tubo de 10x22 mm y se incubaron a 37 °C por una hora. Las células transformantes se inocularon en dos placas de LB sólido con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C toda la noche. Se tomaron cinco colonias de cada una de las transformantes y se extrajo plásmido con GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Se tomaron 400 ng de cada plásmido y se digirieron con el siguiente par de enzimas de restricción: NdeI –Sacl, para mClover, mVenus y mTurquesa2 en amortiguador BamHI, NheI-Sacl para mRuby2 en amortiguador Tango y Sacl-XhoI para la región E del RE en amortiguador BamHI según el siguiente protocolo (Tabla 7). Subclonación de la región E en pET28a (+): Los plásmidos pET28a (+), pJE23 se digirieron con las enzimas Sacl y XhoI durante 1.5 h a 37 °C, bajo el siguiente protocolo (ver Tabla 8).

Tabla 7. Protocolo general de digestión con enzimas de restricción

Reactivos	Volumen a 10 μ L
Amortiguador de BamHI 10x	1 μ L
400 ng de plásmido	Entre 1 y 4 μ L dependiendo del rendimiento de extracción
Enzima de restricción 1 con 10 U/ μ L	0.2 μ L
Enzima de restricción 2 con 10 U/ μ L	0.2 μ L
dH ₂ O	A 10 μ L

Tabla 8. Protocolo para la digestión de pJS23 y pET28a+

Reactivos	Volumen a 150 μ L
Amortiguador de BamHI 10x	15 μ L
5 μ g de plásmido	Entre 15 y 50 μ L dependiendo del rendimiento de extracción
Enzima de restricción 1 con 10 U/ μ L	1 μ L
Enzima de restricción 2 con 10 U/ μ L	1 μ L
dH ₂ O	A 150 μ L

El producto de la digestión del plásmido pET28 a (+) fue purificado con GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Por otro lado, se realizó una electroforesis del producto de digestión del pS23 y se extrajo la porción del gel que contenía el DNA de alrededor de 750 pb, peso que corresponde a la región E(LBD). La porción del gel con el DNA, se hizo pasar por tubo con fibra de vidrio para retener el agar y lixiviar el amortiguador con el DNA. A continuación, se purificó el DNA utilizando GeneJET PCR purification kit (Thermo Fisher Scientific). Las muestras de la región E (LBD) se cuantificaron espectrofotométricamente por Nanodrop. Se diluyó a 10 ng/ μ L cada muestra y por separado se ligaron a pET28a (+) con el siguiente protocolo (ver Tabla 9);

Tabla 9. Protocolo de ligación de pET28a+ con el gen del LBD

Reactivos	Volumen
Amortiguador de ligación 10x	2 μ L
50 ng de plásmido (50 ng/ μ L)	1 μ L
35 ng de inserto (10 ng/ μ L)	3.5 μ L
T4 DNA ligasa 1 U/ μ L	1 μ L
dH ₂ O	A 20 μ L

Las reacciones se incubaron toda la noche a 4 °C. Después se purificaron con 20 μ L de cloroformo. Se extrajo la fase acuosa, se tomaron 2 μ L de la fase acuosa y se electroporaron en *E. coli* DH5 α . Posteriormente se recuperaron durante una hora y se inocularon a medio LB sólido con Km (50 μ g/mL). Las placas se incubaron a 37 °C toda la noche. Se tomaron 5 colonias positivas y se extrajo el plásmido. Se digirieron los plásmidos con SacI-XhoI para corroborar el inserto y se eligió una cepa positiva S2311 para secuenciar su plásmido.

7.3 Fusión de la secuencia codificante para cada una de las proteínas fluorescentes en los plásmidos basados en pET28a(+) que contienen la región E.

Se digirieron los plásmidos pS2311, pJT9, pJV11y pJC10 con el protocolo de la Tabla 10. Por otro lado, los plásmidos pS2311 y pJR16 se digirieron con el protocolo de la Tabla 11. Los productos de digestión fueron purificados con GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). El producto de digestión pS2311 SacI-NdeI se ligó por separado con los productos de pJV11 SacI-NdeI, pJT9 SacI-NdeI y pJC10 SacI-NdeI. Por otro lado, se llevó a cabo la reacción de ligación de pS2311 SacI-NheI y pJR16 SacI-NheI bajo el protocolo de la Tabla 12.

Tabla 10. Protocolo de inserción de los ORF para las PFs, mClover, mVenus y mTurquesa2 en pS2311

Reactivos	Volumen a 50 µL
Fast Digest Buffer 10x	5 µL
3 µg de plásmido	Entre 3 y 15 µL dependiendo de la concentración del plásmido
SacI 10 U/ µL	0.8 µL
dH ₂ O	A 50 µL
Incubar por 1 hora a 37 °C	
Adicionar NdeI 1 U / µL	0.8 µL
Incubar 16 h a 37 °C	

Tabla 11. Protocolo de inserción del ORF para la PF mRuby2 en pS2311

Reactivos	Volumen a 50 µL
Fast Digest Buffer 10x	5µL
3 µg de plásmido	Entre 3 y 15 µL dependiendo de la concentración del plásmido
SacI con 10 U/ µL	0.8 µL
NheI con 10 U/ µL	1.7 µL
dH ₂ O	A 50 µL
Incubar por 16 h a 37 °C	

Tabla 12. Protocolo general de ligación

Reactivos	Volumen a 20 µL
Amortiguador de ligación 10x	2 µL
50 ng de pS2311digerido con NdeI o NheI	5 µL
50 ng de plásmido con gen de proteínas fluorescentes digerido y purificado por columna	5 µL
T4 DNA ligasa 1 U/ µL	1 µL
H ₂ O	A 20 µL

Después de 16 h de incubación a 4 °C, el producto de ligación se purificó con cloroformo y se tomaron 8 µL y se incubaron con 100 µL células de *E coli* BL21 quimiocompetentes; por 20 min a 4 °C. Posteriormente se incubaron a 42°C por 30 s, se incubaron a 4°C por dos min, se recuperaron en 400 µL de medio SOC y finalmente, se incubaron a 37 °C por 1 h. Se tomaron 250 µL de células recuperadas y se inocularon en una caja de LB con kanamicina 50 µg/mL. Posteriormente se incubaron a 37 °C toda la noche. Se seleccionaron

10 colonias de cada cepa (pERT, pERV, pERC y pERR) y se realizó PCR de colonia bajo el siguiente protocolo (Tabla 13):

Tabla 13. Reactivos para PCR de colonia

Reactivo	Concentración inicial	Concentración Final	Volumen (μL) para 20 μL
Colonia	-	-	1 azada
PCR Buffer	10x	1x	2
MgCl ₂	25 mM	2.5 mM	2
dNTPs	2 mM	200 μM	2
Oligos Fw	3 μM	200 nM	1.2
Oligo Rv	3 μM	200 nM	1.2
dH ₂ O	-	-	a 20
DNA polimerasa	1 U/ μL	1 U / 50 μL	1

El PCR se realizó bajo las siguientes condiciones:

Tabla 14. Condiciones para PCR de colonia

Pasos	Temperatura	Tiempo
1. Lisis celular y Desnaturalización de DNA	95 °C	5 min
2. Desnaturalización de DNA	94 °C	15 s
4. Alineamiento	55 °C	15 s
5. Elongación	72 °C	1.5 min
Repetir pasos 2-5 30 veces		
Elongación final	72 °C	5 min
Espera	16 °C	Hasta retirar la muestra

Se tomaron cinco μL de cada tubo de PCR se colocaron en un gel de agarosa 0.8% y aplicándose un voltaje de 75 mV por 45 min. Se seleccionaron cinco colonias positivas para cada construcción y se incubaron en cinco mL de LB km (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se extrajo DNA de plásmido para obtener la secuencia de dos de cada construcción. Se seleccionó una clona positiva de cada construcción: pERT9, pERV1, pERC10 y pERR9.

Los plásmidos se transformaron por separado en la cepa de expresión de *E. coli* BI21 (DE3) según el protocolo de transformación por choque térmico: 100 ng de plásmido se adicionaron en 100 μL de células quimiocompetentes, se incubaron a 4°C por 30 min, posteriormente se incubaron a 42 °C por 30 s. Después se incubaron nuevamente a 4°C por 2 min. Las células se recuperaron en 900 μL de medio SOC y se incubaron a 37 °C por 1 h a 200 rpm. Se tomaron 100 μL de células recuperadas y se inocularon en medio LB km (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), posteriormente se incubaron toda la noche a 37 °C. Las colonias con los plásmidos pERT9, pERV1, pERC10 y pERR9 produjeron las siguientes quimeras, la quimera de mTurquesa2 (Qt), la quimera de mVenus (Qv), la quimera de mClover (Qc) y la quimera de mRuby2 (Qr) respectivamente.

7.4 Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E coli* BL21

De las colonias obtenidas de la transformación, se tomó una azada de una colonia aislada para inocular por separado en 5 mL de medio LB adicionado con kanamicina (50 µg/mL) y se incubaron toda la noche a 37 °C y 200 rpm. Se inoculó un mL de cultivo saturado en 99 mL de medio LB y se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6 (aprox. 2.30 h después de inocular). Después se adicionaron 500 µL IPTG 100 mM (concentración final de 500 µM de IPTG) y se incubaron a 25 °C por 24 h. A partir de este paso se trabajó en frío (4 °C). Los cultivos se centrifugaron por 10 min a 6000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, la pastilla de células se resuspendió en 10 mL de amortiguador de carga (fosfatos 10 mM, 1M NaCl y 45 mM imidazol a pH 7.4), se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de células se resuspendió en 5 mL amortiguador de carga y se le adicionaron 100 µL de EDTA 50 mM, 200 µL del inhibidor de proteasas Complete™ 25X y 50 µL de lisozima 50 mg/mL y se incubó por 30 min. La muestra se sonicó en frío: 10 repeticiones de pulsos de sonicación con 70% de amplitud y 30 s de pausa. Las muestras lisadas se centrifugaron 5 min a 13400 rpm a 4 °C. El sobrenadante se extrajo y se eliminó la pastilla. Para unir el níquel a la columna se hizo pasar por la columna de afinidad HisTrap HP de 5 mL y con ayuda de una bomba peristáltica (Econo Gradient Pump de Bio Rad) 5 mL de NiSO₄ 0.1 M a un flujo de 1 mL/min. Posteriormente se lavó con 5 volúmenes de amortiguador de carga. En seguida la muestra se hizo pasar por la columna a un flujo de 1 mL/min hasta ver la retención de la proteína en la columna (debido a que las quimeras son coloridas se puede observar la retención de la proteína en la columna), después se lavó con 5 volúmenes de amortiguador de carga y 5 volúmenes con amortiguador de lavado (10 mM fosfatos, 1 M NaCl y 100 mM de imidazol) a un flujo de 3 mL/min. Finalmente, se hicieron pasar por la columna 5 volúmenes de amortiguador de elución (10 mM fosfatos, 1M NaCl y 500 mM de imidazol) a un flujo de 3 mL/min. La pureza de las fracciones obtenidas se analizó en geles de poliacrilamida al 10%, los reactivos se muestran en las Tablas 15 y 16).

Los reactivos del gel separador se mezclaron en orden descendente los reactivos del gel separador y la mezcla se colocó en el sándwich de cristal soportado por el marco y se le agregó etanol para evitar burbujas. Se dejó polimerizar por 25 min. Al finalizar la polimerización, se retiró el etanol. Los reactivos del gel concentrador se mezclaron en orden descendente y con esta solución se llenó el sándwich de cristal. Se colocó el peine con 10 greclas y la mezcla se dejó polimerizar por 25 min. Se tomaron 20 µL de las fracciones cromatográficas, se les adicionaron 10 µL de amortiguador de carga para proteínas y,

finalmente, se incubaron a 90 °C por 10 min. Las muestras se cargaron en el gel de poliacrilamida y se corrieron a 80 mV por 20 min y después a 120 mV por 1.5 h. Los geles se tiñeron con Coomassie y se revelaron con una solución reveladora (10% ácido acético).

Tabla 15. Gel separador

Reactivo	Volumen (mL)
Agua	4
Tris pH 8.8	2.5
Acrilamida	3.3
SDS	0.1
PSA	0.1
TEMED	0.007

Tabla 16. Gel concentrador

Reactivo	Volumen (mL)
Agua	2.8
Tris pH 6.8	0.5
Acrilamida	0.66
SDS	0.04
PSA	0.04
TEMED	0.007

Las fracciones que contenían a la quimera y la banda de 25 kDa se mezclaron y se dializaron durante 4 h y a 4 °C en amortiguador fosfatos 10mM pH 7.4 en una membrana con un tamaño de poro con corte hasta 30 kDa esperando que la proteína de 25kDa dializara. Se repitió la diálisis bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se cargaron en una columna de intercambio aniónico (DEAE) con un flujo de 1 mL/min. La resina en la columna se lavó con 5 volúmenes de amortiguador de fosfatos 10 mM con un flujo de 3 mL/min, 5 volúmenes de amortiguador de lavado (fosfatos 10 mM, 150 mM NaCl pH 6) y, finalmente, con 5 volúmenes de amortiguador de elución (fosfatos 10 mM, 500 mM NaCl pH 6). Las fracciones se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 10%. Se mezclaron las fracciones que contenían a la quimera sin la fracción de 25 kDa y se dializaron en 2 pasos repetitivos con una membrana con un límite de filtración de hasta 30 kDa en amortiguador fosfatos 10mM pH 7.4 durante 4 h a 4 °C. La quimera se preservó en glicerol a una concentración final de 50% glicerol v/v y a -20°C.

7.5 Ensayos FRET

Para los experimentos de fluorescencia se usó el equipo LS 55 Fluorescence Spectrometer de Perkin Elmer. Se usó una celda de 100 µL para realizar la lectura. Para medir la emisión de la quimera de mTurquesa2 (Qt) se usó $\lambda_{excitación}= 434$ nm, el máximo de excitación para la PF mTurquesa2 y se registró la intensidad de fluorescencia (IF) a $\lambda_{emisión}=474$ nm, se ajustó el slit de excitación a 2.5 y el slit de emisión a 6. Para medir la emisión de la Qt, se colocaron 1.2 µg de Qt en un tubo Eppendorf de 600 µL y se adicionó amortiguador de fosfatos 10 mM pH7.4 con o sin aditivos (2 M de urea, 0,05 % y 0.01 % Tween 20 y 0.02 %

y 0.01 % de Tritón x-100, 0.05 % ó 0.1 % de SDS). La adición de estradiol disuelto en isopropanol fue variable, pero el volumen de isopropanol se ajustó a 5 µL y, posteriormente, se aforó hasta alcanzar un volumen final de 120 µL en la muestra. Para las mediciones a tiempo 0, las lecturas se realizaron justo después de mezclar los componentes. Para tiempos más prolongados, las muestras se incubaron a temperatura ambiente en ausencia de luz. Pasado el tiempo de incubación se registró la fluorescencia. Para medir la emisión de la Qt en presencia de la quimera de mVenus (Qv) se colocaron en un tubo Eppendorf 1.2 µg de Qt y 1.2 µg de Qv, se adicionó amortiguador suficiente para alcanzar un volumen de 120 µL. Se incubó el tiempo necesario hasta detectar la fluorescencia. Para medir la emisión de la Qt en presencia de la quimera venus y E2 se colocaron en un tubo Eppendorf 1.2 µg de Qt, 1.2 µg de Qv y 5 µL de E2 disuelto en isopropanol y se adicionó amortiguador con o sin aditivos hasta alcanzar un volumen de 120 µL. Se incubó el tiempo necesario a 25° C y en ausencia de luz hasta detectar la fluorescencia. Se ajustaron las concentraciones de E2 en isopropanol para mantener el mismo volumen de isopropanol (5 µL).

8 Resultados

8.1 Construcción de las quimeras.

Se construyeron las fusiones de forma racional entre el LBD del RE (S302 al R552) y los pares FRET mVenus y mTurquesa2 (pares FRET tradicionales) y mClover y mRuby2 (pares FRET mejorados) sobre el vector de expresión pET28a(+) con el propósito de sobreexpresar las quimeras. Para construir las fusiones los oligonucleótidos se diseñaron para que las proteínas fluorescentes se fusionaran en el N-terminal del LBD del RE, debido a que la unión al C-terminal podría interferir con la unión al ligando o con la estabilidad de la señal (Dumbrepatil et al. 2010). Los sitios de restricción se eligieron con base en los sitios de restricción que tiene el plásmido pET28a (+), del N-terminal a C-terminal son los siguientes, NdeI/NheI – SacI – XhoI, como se observa en la Figura 4.

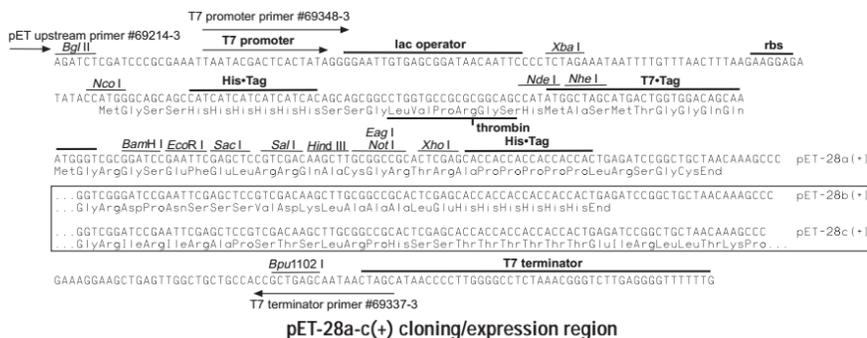


Figura 4. Esquema del sitio múltiple de restricción del pET 28a (+)

Las proteínas fluorescentes comparten los ocho primeros aminoácidos del N-terminal y los siete últimos del C-terminal. En sus secuencias de DNA, mClover, mVenus y mTurquesa2 comparten un 100% de similitud en el extremo 5' y 3'. Mientras que mRuby2 difiere en cuatro nucleótidos en el extremo 5' y en un nucleótido en el extremo 3', por lo que al menos tres de los genes de las PF pueden amplificarse con un par de oligonucleótidos. mClover, mVenus y mTurquesa2 se amplificaron con los oligonucleótidos Tak190 y N7. El oligonucleótido Tak190 alinea con el extremo 5' de las PF y en su extremo 5' se encuentra el sitio de restricción NdeI. El oligo N7 tiene en su extremo 5' al conector flexible GGSGG y al sitio SacI y alinea con el extremo 3' de la PF. Debido a que mRuby2 tiene un sitio de corte interno NdeI, se optó por amplificar a la proteína con el oligonucleótido Tak141 que en su extremo 5' contiene al sitio NheI. El inconveniente de este oligonucleótido es que cuatro de sus nucleótidos no alinean con el gen de la PF. El oligonucleótido N7 tiene un sitio EcoRI que permite modificar la longitud del conector, en caso de ser necesario. La flexibilidad y longitud del conector son muy importantes en el diseño de sistemas FRET (Evers et al. 2006). Los oligonucleótidos N3 y N4 contienen en su extremo 5' los sitios de corte SacI y XhoI, respectivamente, y amplifican a la región del LBD del RE del aminoácido S302 al R552. Eiler S., et al. (2001) lograron expresar este fragmento en gran cantidad y sin modificaciones químicas, aunque estabilizan el LBD con E2.

Ligación de los genes en el pJET1.2

Para amplificar los fragmentos se realizó inicialmente un gradiente de temperatura para conocer la temperatura óptima de alineación. Los resultados mostraron solo una banda para casi todas las temperaturas lo que indica que los oligonucleótidos son específicos y por tanto se eligió la temperatura de 55 °C para amplificar a todas las regiones codificantes de las proteínas fluorescentes. En un análisis *in silico* se encontró, al diseñar los oligonucleótidos, que todos presentaron energías libre de Gibbs mayores de -6 kcal/mol

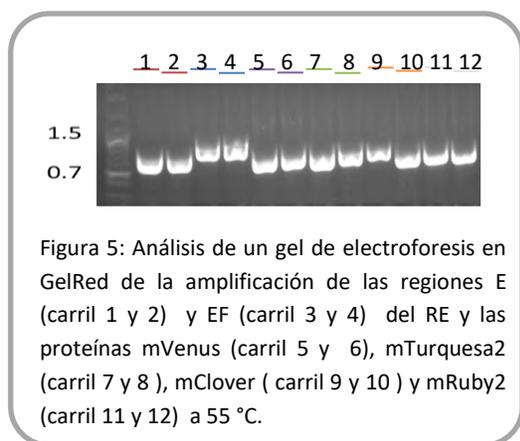


Figura 5: Análisis de un gel de electroforesis en GelRed de la amplificación de las regiones E (carril 1 y 2) y EF (carril 3 y 4) del RE y las proteínas mVenus (carril 5 y 6), mTurquesa2 (carril 7 y 8), mClover (carril 9 y 10) y mRuby2 (carril 11 y 12) a 55 °C.

para la formación de homodímeros u horquillas, por lo que se esperaba especificidad, debido a que energía de Gibbs menores el proceso de formación de homodímeros u horquillas es espontáneo (Premier Biosoft n.d.). La amplificación de la región codificante de mRuby2 con los oligonucleótidos tak141 y N7 mostró una sola banda, aunque ambos oligonucleótidos no alinean completamente en el extremo 3' de la

región codificante de mRuby2. Este resultado podría deberse a la actividad correctora de la DNA polimerasa y al alto contenido de CG en esa región. Por tal razón se utilizaron esos oligonucleótidos para amplificar al gen, aunque se formaran mutaciones sinónimas. En la Figura 5 se muestra por duplicado la migración electroforética de los amplicones obtenidos y se observa una banda en el tamaño esperado de aproximadamente 700 pb correspondiente a la región codificante para las proteínas fluorescentes y para la región E del RE, y de aproximadamente 900 pb para la región que corresponde a los dominios E y F del RE. Para facilitar el proceso de fusión entre los fragmentos de DNA codificantes de las proteínas fluorescentes y de la región E al vector pET28a (+) se decidió ligar estos amplicones al plásmido pJET1.2-blunt, un vector que facilita la manipulación del fragmento amplificación, debido a su alto número de copias del vector, esto con el fin de obtener una mayor cantidad de inserto. También permite observar cualitativamente si la digestión es parcial o completa, ya que en la digestión de un fragmento con los sitios de restricción en los extremos no se observaría la digestión completa. La inserción de los fragmentos codificantes al pJET1.2, se corroboró por el análisis del patrón de restricción de los plásmidos de las colonias con resistencia a ampicilina (ver Figuras 6 y 7). Los plásmidos con los insertos que codifican al LBD del RE y a las PF que no presentaron mutaciones no-sinónimas (pero si sinónimas para el gen de mRuby2) y que se subclonaron al plásmido pET28 fueron los plásmidos, pJS23 que contiene al LBD-RE, pJT9 que contiene a mTurquesa2, pJC10 que contiene a mClover, pJR16 que contiene a mRuby2 y pJV11 que contiene a mVenus.

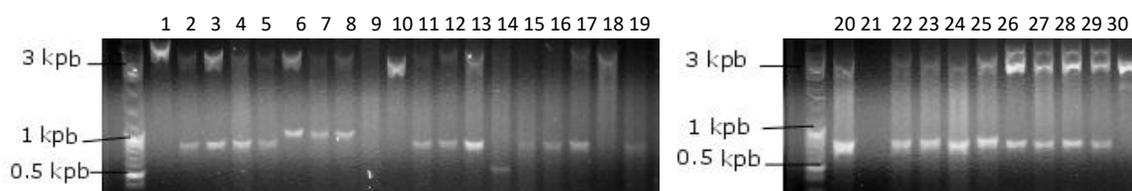


Figura 6: Análisis por gel de electroforesis con GelRed de la digestión de los plásmidos derivados del pJET1.2 con los genes de interés. Plásmidos con la región del LBD, carriles 1-5 (pJE1, pJE11, pJE23, pJE31, pJE44). Plásmidos con la región LBD-F, carriles 6-10 (pJEF1, pJEF15, pJEF18, pJEF29, pJEF28). Plásmidos con el gen de mVenus, carriles 11-15 (pJV3, pJV11, pJV31, pJV36, pJV45). Plásmidos con el del de mTurquesa2, carriles 16-20 (pJT6, pJT24, pJT27, pJT38, pJT47). Plásmidos con el gen de mRuby2, carriles 21-25 (pJR1, pJR10, pJR11, pJR24, pJR36). Plásmidos con el gen de mClover, carriles 26-30 (pJC8, pJC10, pJC20, pJC38, pJC36). Los plásmidos de la serie pJE y pJEF fueron digeridos con las enzimas SacI y XhoI, se observan bandas aproximadas de 750 y 900 pb respectivamente. Los plásmidos de la serie pJV, pJT y pJC se fueron digeridos con las enzimas NdeI-SacI y se observaban bandas de aproximadamente 700 pb. El vector pJET1.2 tiene un tamaño de 2.9 kpb, Los plásmidos de la serie pJR fueron digeridos con las enzimas NheI-SacI y observan con tamaños de 700 pb.

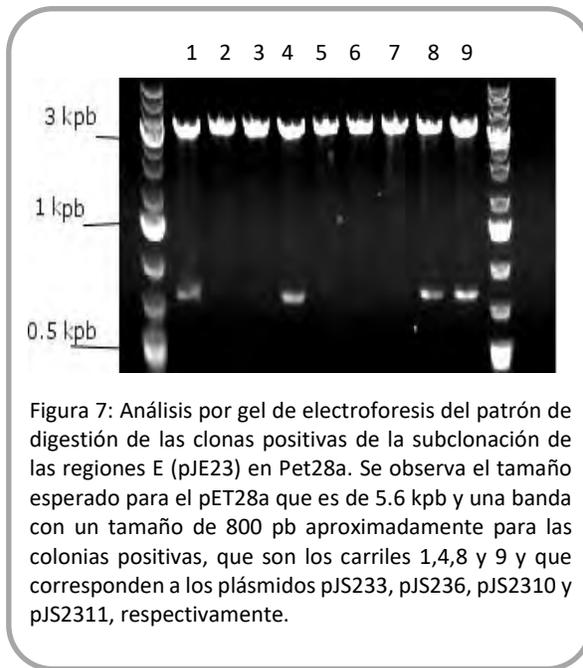


Figura 7: Análisis por gel de electroforesis del patrón de digestión de las clonas positivas de la subclonación de las regiones E (pJE23) en Pet28a. Se observa el tamaño esperado para el pET28a que es de 5.6 kpb y una banda con un tamaño de 800 pb aproximadamente para las colonias positivas, que son los carriles 1,4,8 y 9 y que corresponden a los plásmidos pJS233, pJS236, pJS2310 y pJS2311, respectivamente.

Subclonación de los fragmentos al vector de expresión pET28 a (+)

El esquema general de los plásmidos con la fusión quimérica se observa en la Figura 8.

En el plásmido pET28 los sitios de inserción de los genes recombinantes están corriente arriba del promotor T7, el cual está regulado por el represor Lac. Corriente arriba del codón de inicio se encuentra una etiqueta de polihistidinas (6xHis) y un sitio de corte de trombina. Gracias a la etiqueta de 6xHis la proteína recombinante se puede purificar por cromatografía de afinidad de metal

inmovilizado (IMAC por sus siglas en inglés, immobilized metal affinity chromatography) y, en principio, alcanzar una pureza mayor al 80% en un solo paso de purificación (Kimple et al. 2013). El sitio de trombina permite eliminar el tag de 6xHis.

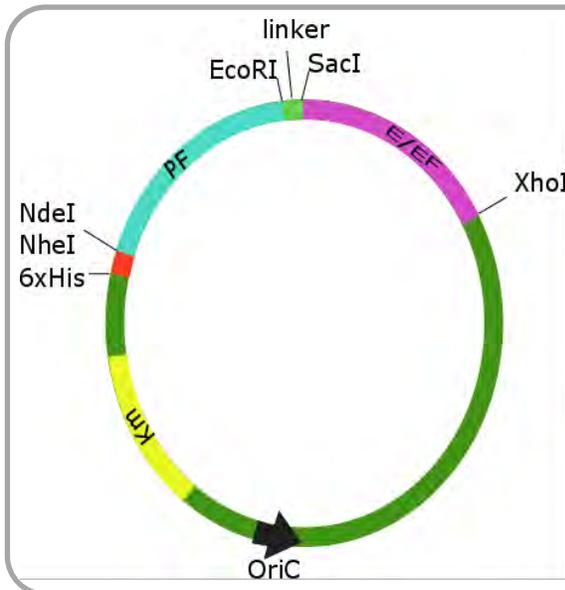


Figura 8: Esquema general de la construcción entre las regiones del ER (E y E/F) y las proteínas fluorescentes. La base de las construcciones es el vector de expresión pET28a que tiene un origen del pBR322 y resistencia a kanamicina. En el extremo amino se encuentra una secuencia que codifica para seis residuos de histidina consecutivos que se conocen como etiqueta 6xHis, corriente arriba se encuentra el sitio NdeI en donde se insertarán las PF: mClover, mTurquesa2 y mVenus. Ruby estará flanqueado por un sitio NheI debido a que tiene el sitio de restricción de NdeI. Entre los sitios EcoRI y SacI se encuentra un conector flexible que puede ser modificado. La región E y E/F se encuentran flanqueados por los sitios SacI y XhoI

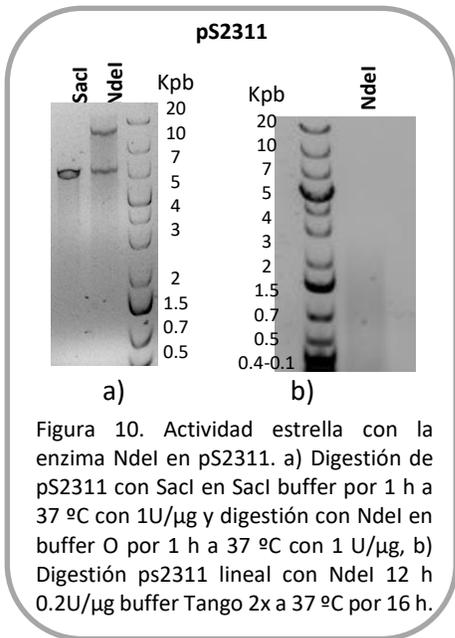
Debido a que el LBD se encuentra en todas las quimeras primero se subclonó el inserto del plásmido pJ23 en el pET28a(+) con el fin de utilizarlo como un vector base para después ligar todas las PF. Debido a que el pET28a(+) y pJET1.2 confieren resistencia a diferentes antibióticos no fue necesario purificar los fragmentos correspondientes a partir de bandas del gel de agarosa. Los productos de digestión se purificaron por columnas de sílice y se



ligaron. El análisis del patrón de restricción de las colonias positivas (ver Figura 9) y la secuenciación del plásmido de una de ellas, el plásmido pS2311, confirmaron la inserción correcta del LBD al plásmido pET28a(+). Por tanto, se utilizó este plásmido como base para subclonar los las regiones codificantes de las PF. A continuación, se digirieron los plásmidos con los fragmentos codificantes de las PFs (pJT9, pJC10 y pJV11) y el pS2311 en una doble digestión con *SacI* y *NdeI*; sin embargo, en diferentes amortiguadores las enzimas mostraron digestión parcial y/o actividad estrella (Figura 10). Por ello, se modificó el número de unidades por μg de DNA y el tiempo de incubación sin lograr evitar la actividad estrella y la digestión parcial.

La actividad estrella se presenta cuando una enzima de restricción corta secuencias que son similares, pero no idénticas, en condiciones no óptimas, como son: concentraciones de glicerol mayores del 5%, alta

concentración de enzima (mayor a $100 \text{ U}/\mu\text{g}$ de DNA), baja fuerza iónica (menor a 25 mM de sal), alto pH (mayor de 8), etanol, y la presencia de metales divalentes como Mn (II) y Co (II) (New England Biolabs 2018). Para disminuir la actividad estrella se decidió entonces probar con diferentes amortiguadores (ver Figura 10), ya que presentan diferente fuerza



iónica o componentes adicionales que pueden estabilizar a la enzima, como son el Tritón o el suero fetal bovino. La doble digestión con *SacI* en Tango 1X y después con *NdeI* en tango 2X mostró que en la digestión con *NdeI* se presentaba actividad estrella (ver Figura 10b). Lo que indica que *NdeI* es quien presenta la actividad estrella. Para evitar la actividad estrella es necesario utilizar un amortiguador que mantenga a la enzima en condiciones óptimas; se puede utilizar espermidina, SDS del 0.1-0.5%, o se pueden utilizar mutantes (Pingoud et al. 2014). *NdeI* FastDigest (FD) (Fermentas) es una variante que por su alta actividad y especificidad disminuye la posible

actividad estrella. Por tal motivo se decidió a utilizar esta enzima para las digestiones. Se encontró que el plásmido pS2311 logra digerirse completamente y sin actividad estrella en

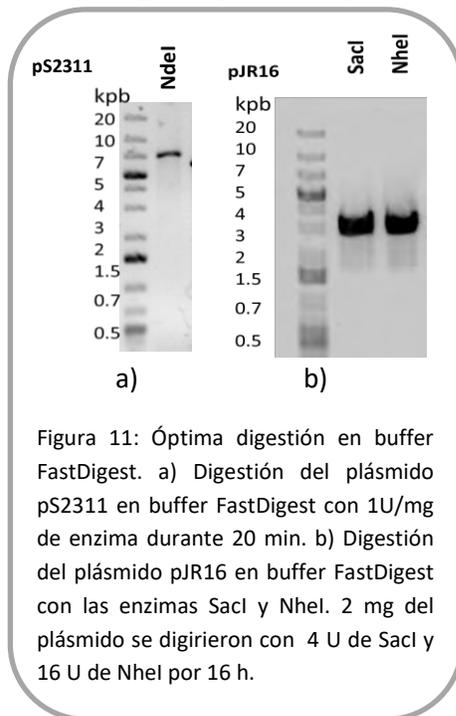


Figura 11: Óptima digestión en buffer FastDigest. a) Digestión del plásmido pS2311 en buffer FastDigest con 1U/mg de enzima durante 20 min. b) Digestión del plásmido pJR16 en buffer FastDigest con las enzimas SacI y NheI. 2 mg del plásmido se digirieron con 4 U de SacI y 16 U de NheI por 16 h.

20 minutos (ver Figura 11a) Para conocer si la enzima SacI era capaz de digerir en buffer FD se digirió el plásmido pS2311 en dicho amortiguador y se encontró que si tenía actividad, pero la digestión era parcial. Por tal motivo se hizo una cinética de digestión y se encontró que SacI era capaz de digerir pS2311 sin actividad estrella en 16 h. De esta forma se lograron digerir eficientemente los plásmidos. Las reacciones de digestión de pJR16 con NheI y SacI mostraron que NheI no es muy eficiente (ver Figura 12). En la página de New England Biolabs mencionan que se requieren 10 U para digerir 1 µg de pBR322 en mientras que se necesitan solo 3 U de NdeI para digerir 1 µg de pBR322. Por tal motivo también se usó el buffer FD, y aunque hay digestión parcial la actividad estrella disminuye (ver Figura 11b). Debido a estos resultados se realizaron las digestiones con el buffer FD para obtener las construcciones. El buffer FD parece otorgarles a las enzimas gran especificidad, aunque el tiempo de digestión es largo.

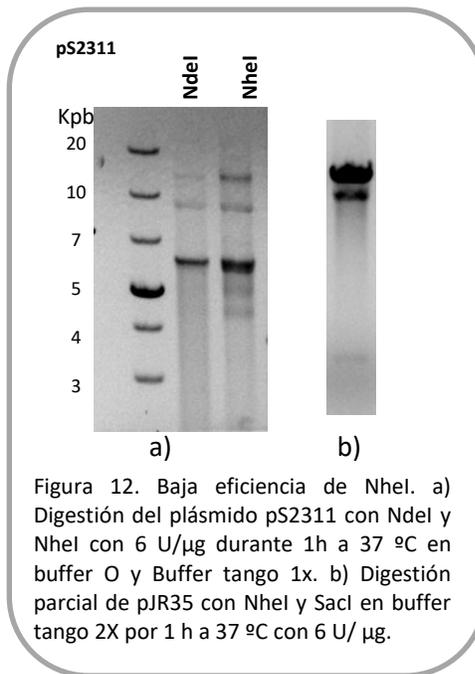


Figura 12. Baja eficiencia de NheI. a) Digestión del plásmido pS2311 con NdeI y NheI con 6 U/µg durante 1h a 37 °C en buffer O y Buffer tango 1x. b) Digestión parcial de pJR35 con NheI y SacI en buffer tango 2X por 1 h a 37 °C con 6 U/ µg.

La ligación de los insertos de las PF en el pS2311 dio lugar a los siguientes plásmidos sin mutaciones no-sinónimas: pERC10, pERV1, pERT9 y pERR9. pERRR9 y pERVI presentaron mutaciones sinónimas, los codones a los que codifican tienen frecuencias similares a los codones originales.

8.2 Expresión de proteínas en *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Se decidió expresar las quimeras en *E. coli* para obtenerlas solubles, estables y en gran cantidad. Por lo que se hicieron experimentos cualitativos para encontrar las condiciones óptimas de expresión.

Para expresar proteínas heterólogas el huésped por excelencia ha sido la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) que ha sido evolucionada para sobreexpresar proteínas recombinantes. Esta bacteria es lisogénica del bacteriófago DE3 el cual contiene en su secuencia el gen de la T7 DNA polimerasa que reconoce al promotor fuerte T7 de los plásmidos derivados del pET. La sobreexpresión del gen recombinante depende de la inducción con IPTG, además estas bacterias carecen de los genes OmpT y Lon que codifican a proteasas que son responsables de la degradación de proteínas recombinantes. Por tal motivo se empleó esta cepa para expresar a las quimeras y se evaluó las condiciones de expresión para obtener a las quimeras.

Una vez elegida la cepa se transformaron los plásmidos en *E. coli* BL21 (DE3). Para inducir, se realizaron análisis cualitativos de la temperatura y cuantitativos de la cantidad de IPTG. Para la elección de la temperatura se tomaron en cuenta 2 antecedentes. Primero se eligieron temperaturas de inducción bajas, 25 y 15 °C, ya que una baja temperatura influye en el plegamiento de las proteínas. Se tomó en cuenta que a 25 °C Eiler S. et al. encontraron que en la condición de 25 °C obtenían mayor cantidad de ER-LBD en comparación con la cantidad que obtenían a 15 y 37 °C. Segundo, las proteínas fluorescentes han sido evolucionadas (Nagai et al. 2002) para plegarse y formar su cromóforo (madurar) de forma eficiente a 37 °C. Por ejemplo, para mTurquesa2, el tiempo que tarda en madurar es de alrededor de 3 h a 32 °C mientras que para venus es de alrededor de 1.5 h a las mismas condiciones (Balleza et al. 2018). Para GFP el tiempo de maduración a 22 °C es de 4 horas, por lo que se esperaría que a 25 °C el tiempo de incubación fuera alrededor de 4 horas. Durante la expresión de las proteínas se observó, cualitativamente, que a 25 °C el cultivo presentaba un desarrollo del color generado por la expresión de proteínas fluorescentes. Este cambio de color aparece hasta después de las 8 h de inducción. El desarrollo del color a 15 °C es muy lento y después de 24 h se observa muy poco desarrollo de color lo que implica o menor expresión de proteína o una baja velocidad de maduración. Debido a esto se eligió la temperatura de 25 °C para expresar las quimeras.

Se analizó por fluorescencia la concentración óptima de IPTG para inducir, ya que el IPTG suele ser tóxico para las bacterias. Se encontró que no había mucha diferencia entre la concentración de IPTG entre 0.2 M y 0.4 M y la señal de fluorescencia del extracto crudo, por lo que se eligió la concentración de 0.4 M de IPTG para inducir (ver Tabla 19)

Tabla 19. Intensidad de fluorescencia de una dilución 1:100 del extracto crudo de la Qv

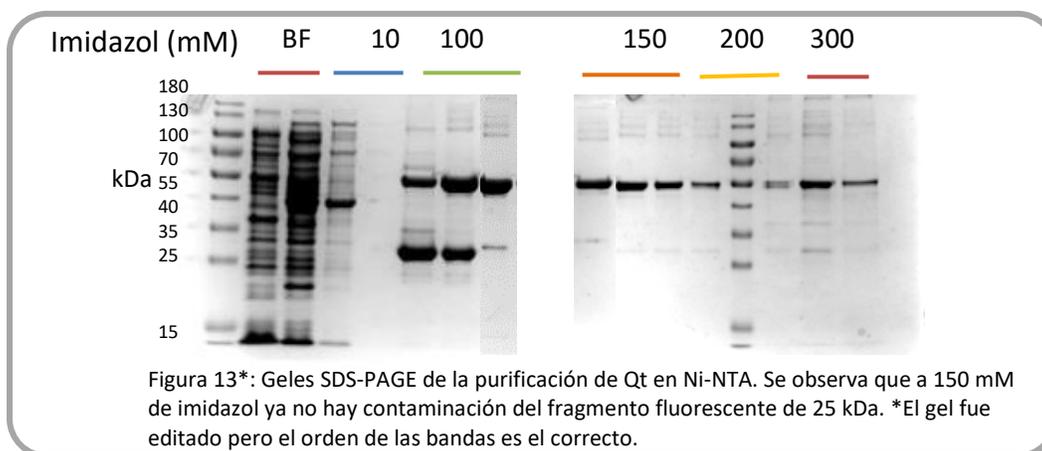
Intensidad de fluorescencia (1:100) a 2.5 de Slit de excitación y emisión.	IPTG (M)
4900	0.2
5200	0.4
4500	0.6

La inducción a 25 °C durante toda la noche con 0.4 M de IPTG permite obtener células con proteínas heterólogas solubles y brillantes.

8.3 Purificación de las quimeras por cromatografía de afinidad Ni-NTA

Debido a que las proteínas tienen una etiqueta de polihistidina (6xHis) se buscaron las condiciones óptimas para purificar a las quimeras, ya que se puede lograr obtener proteínas con purezas mayores al 80%.

Para la purificación de las quimeras, las células bacterianas que las contienen se sometieron a sonicación, después de lo cual se centrifugaron y el sobrenadante se hizo pasar por una columna con IMAC-Ni con 45 mM de imidazol y 1M de NaCl con el propósito de evitar uniones inespecíficas de proteínas con alto contenido en histidinas o con carga suficiente para unirse a la columna de Ni (Ge Healthcare 2012). Se optimizó la purificación con la quimera del LBD-mTurquesa2 (Qt) y para ello, se realizaron lavados con 100, 150, 200 y 300 mM de imidazol (ver Figura 13). Después del lavado con 100 mM (carriles 6, 7 y 8), todas las fracciones con diferentes concentraciones de imidazol presentaron coloración, lo que indicaba la presencia de la proteína fluorescente. También se puede observar que a



100 mM hay dos proteínas abundantes que se unen a la columna, una de aproximadamente 55 kDa que concuerda con el peso molecular estimado de la Qt y otra proteína de entre 25 y 35 kDa. Se puede observar que, a partir de 150 mM de imidazol (carriles 7, 8 y 9), la Qt, de aproximadamente 55 kDa se encuentra pura (ver Figura 11). Sin embargo, este patrón de elución, donde se obtiene la quimera pura después de los lavados de 100 mM de imidazol sólo se obtuvo al purificar la proteína Qt. Para las quimeras de mVenus (Qv), la quimera de mClover (Qc) y la quimera de mRuby2 (Qr), los lavados con 100 mM de imidazol no lograron remover por completo la banda de aproximadamente 25 kDa (ver Figura 14).

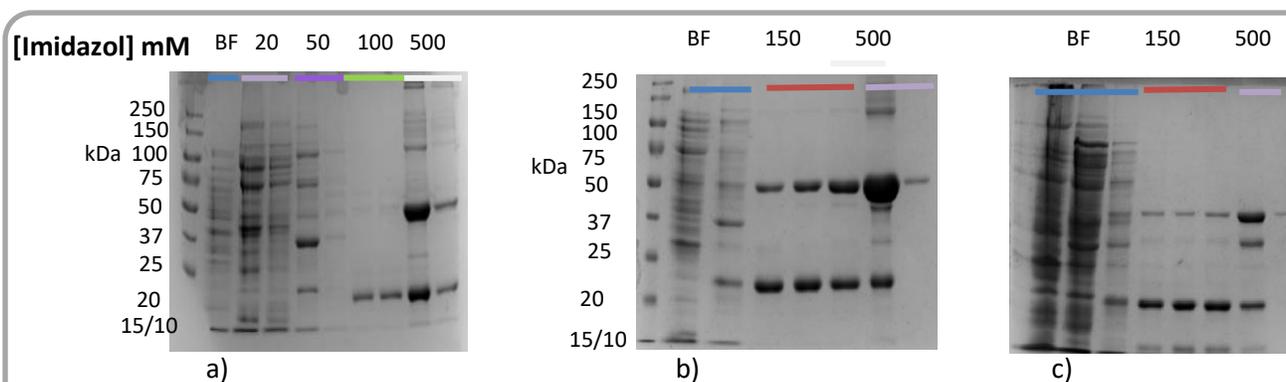


Figura 14. Geles SDS-PAGE de la purificación con Ni-IMAC de Qv, Qc y Qr. En los geles se muestran fracciones con diferentes concentraciones de imidazol. a) purificación de Qv. b) purificación de Qc. c) purificación de Qr. Se observa que todas tienen una banda en aproximadamente 25 kDa y que esta no se logró remover con 100 mM de imidazol.

En las fracciones en donde se encontró solamente la proteína de aproximadamente 25 kDa, se observó color y se detectó fluorescencia, lo que sugiere que la quimera se degrada y que el fragmento de 25 kDa podría ser la PF, que se une a la columna de IMAC-Ni debido a que tiene en su N-terminal la etiqueta de 6xHis. Un espectro de fluorescencia de estas fracciones comprobó que se trata de la proteína fluorescente (Figura 15). El LBD del receptor de estrógeno tiene un peso molecular aproximado de 32 kDa, pero en principio no se uniría a la columna debido a que no tiene el 6xHis tag de histidinas.

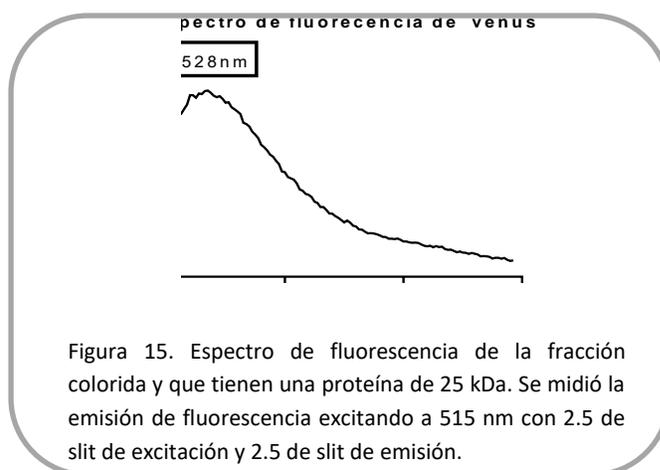


Figura 15. Espectro de fluorescencia de la fracción colorida y que tienen una proteína de 25 kDa. Se midió la emisión de fluorescencia excitando a 515 nm con 2.5 de slit de excitación y 2.5 de slit de emisión.

Debido a que la Qt sigue eluyéndose con 500 mM de imidazol, se decidió usar esta concentración como concentración máxima para eluir la proteína. Por tal motivo se hizo un lavado con 100 mM de imidazol para eluir la fracción fluorescente de 25 kDa y un lavado con alta concentración de imidazol (i.e. 500 mM) para eluir Qt. Para las demás quimeras se siguió un procedimiento similar (ver Tabla 20).

Tabla 20. Resumen de la elución de quimeras de IMAC

Quimera	[Imidazol] para remover fracción de 25 kDa	[imidazol] para eluir quimera	Observaciones
Qt	100 mM	500 mM	Se separa la Qt de la fracción de 25 kDa
Qv	100 mM	500 mM	No se separa la Qv de la fracción de 25 kDa.
Qc	100 mM	500 mM	No se separa la Qc de la fracción de 25 kDa.
Qr	100 mM	500 mM	No se separa la Qr de la fracción de 25 kDa. Aparece una banda de 30kDa.

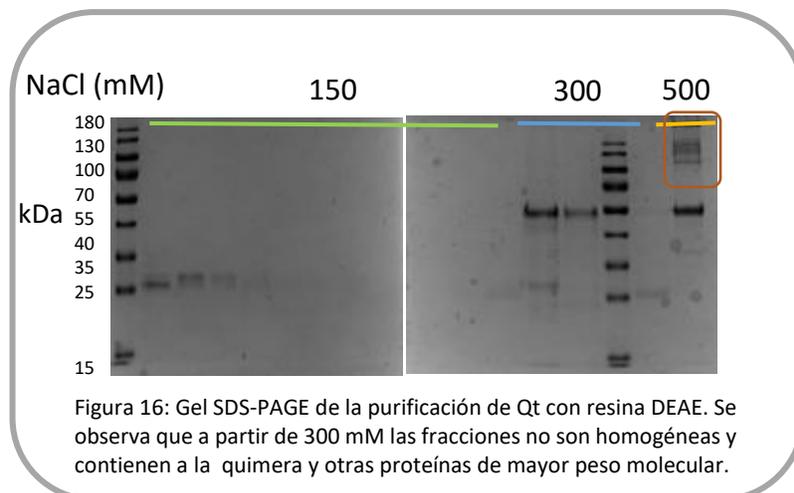
Según reportes en la literatura, las proteínas con etiquetas de 6xHis usualmente eluyen con máximo 300 mM de imidazol; la unión depende de la accesibilidad de las histidinas y el estado oligomérico de la proteína (Bornhorst & Falke 2000). En el caso de la β -galactosidasa de *Thermus* sp y el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en ingles tumor necrosis factor), ambos forman oligómeros y la purificación de estos sólo se logra con altas concentraciones de imidazol, el uso de agentes surfactantes o la elución con EDTA, estas proteínas se eluyen en esas condiciones debido a que los oligómeros se unen muy fuertemente a la resina (Kenig et al. 2006; Pessela et al. 2003). La presencia de la proteína quimera en las diferentes fracciones desde 100 mM a 500 mM de imidazol podría indicar que la quimera presenta dos o más estados oligoméricos o que las histidinas presenta varios grados de accesibilidad. Como se verá más adelante, otros resultados también sugieren que la quimera se está agregando en oligómeros.

En estos experimentos se encontró que durante toda la purificación se encuentra una banda de aproximadamente 25 kDa que fluórese y concuerda con el peso molecular de las PF, lo que nos hace pensar que se trata de un fragmento de la quimera con la proteína fluorescente y que se une a la columna ya que contiene en su N-terminal una etiqueta de 6xHis. Este Fragmento eluye aunque no completamente con 100 mM de imidazol, mientras

que la quimera eluye con concentraciones que van desde 100 mM hasta 500 mM de imidazol lo que podría indicar que la quimera se encuentra como una mezcla de oligómeros.

8.4 ***Purificación de las quimeras con el fragmento fluorescente por intercambio aniónico***

Con el fin de eliminar la fracción de 25 kDa de las quimeras purificadas con Ni-IMAC, se decidió purificar por cromatografía de intercambio aniónico (DEAE) la mezcla de proteínas. El punto isoeléctrico (pI) calculado es en promedio 6.2 para las PFs y 6.4 para las quimeras (Q). Al cargar a la columna, las proteínas se encontraban en un amortiguador pH 7.4. A este pH las proteínas tendrían carga negativa, por lo que deberían unirse a la columna. Los lavados con amortiguador de fosfatos pH 6 deberían cambiar la carga neta de las proteínas a ligeramente positivas, lo que permitiría su elución. Sin embargo, lo que observamos fue que las proteínas se retienen en la columna y sólo eluyen con diferentes concentraciones de NaCl. Esto implica que el pI de las proteínas podría ser menor que 6, en donde aún mantienen su carga negativa. Como se observa en la Figura 13, de 25 a 150 mM de NaCl el fragmento fluorescente de 25 kDa eluye, mientras que la quimera se retiene en la columna y eluye con 300 y 500 mM de NaCl. Esta forma de eluir implica que podría haber distintas formas de la quimera. También se observa que en las fracciones eluidas con 500 mM de NaCl no se alcanza la homogeneidad de las quimeras, pues todavía hay proteínas de mayor peso molecular en las fracciones que las contienen (ver recuadro en Figura 16). Por tanto, con este proceso se pudo eliminar la proteína de aproximadamente 25 kDa. Posteriormente se decidió trabajar con las fracciones de eluidas con 500 mM de NaCl en donde se veía mayoritariamente a la quimera. Estas fracciones se concentraron, dializaron y almacenaron a 4 °C.



8.5 **Degradación de las quimeras**

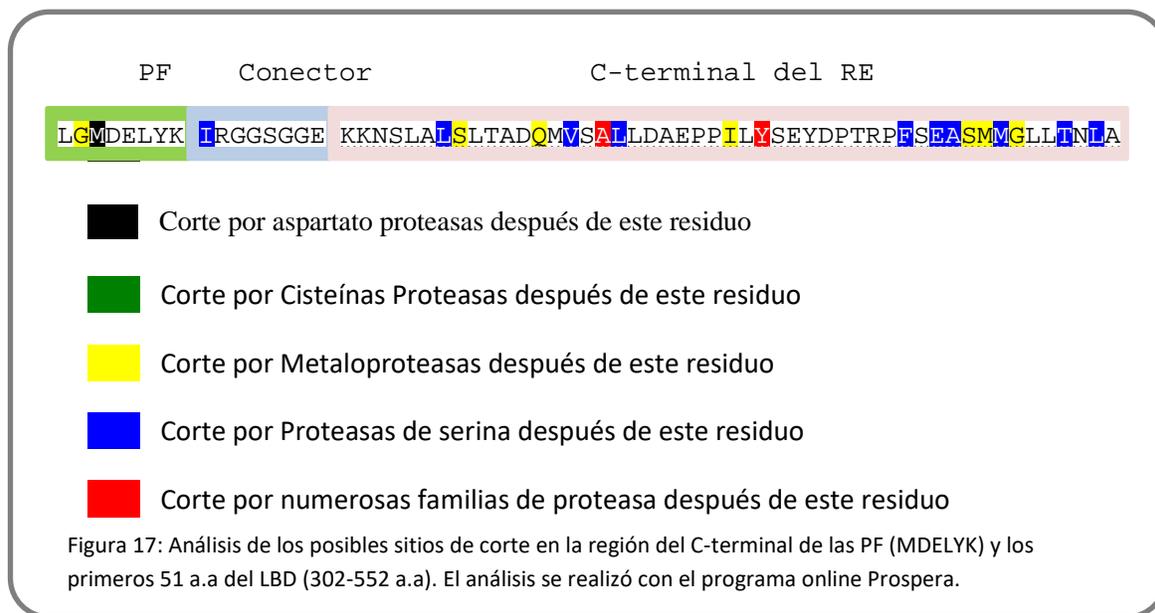
Uno de los problemas a los que nos enfrentamos fue que las quimeras se degradaban y encontramos que al purificar a la Qv una fracción que contenía a una proteína con peso molecular aproximado de 25 kDa que presentaba un espectro de fluorescencia que correspondía a la proteína fluorescente mVenus. Por lo que se buscó primero disminuir la degradación al agregar inhibidores de proteasa sin tener éxito, por lo que se una de nuestras hipótesis es que la degradación podría ser espontánea.

Para determinar si la degradación de las quimeras era hidrólisis catalizada por proteasas o espontánea se siguieron varias estrategias. Se realizó un estudio *in silico* para determinar posibles proteasas que pudiesen digerir a la quimera y se analizaron los sitios de proteólisis de la quimera. Para el estudio *in silico* se tomó en cuenta que: (1) la banda de aproximadamente 25 kDa fluórese y concuerda con el peso molecular de las PF, 2) se sabe que las PF pierden la fluorescencia cuando se eliminan fragmentos mayores a 15 aminoácidos en el C-terminal (Li et al. 1997), 3) todas las quimeras se degradan y liberan a la PF, entonces podrían estar degradándose en un sitio común. Las PFs comparten sólo ocho aminoácidos en el C-terminal (GMDELIK) por lo que el posible sitio de hidrólisis se encontraría a partir de esa región. Tomando en cuenta los anteriores puntos, se hizo el análisis de los sitios de restricción a partir de los últimos ocho aminoácidos que comparten las PF. 4) no hay reportes actuales de la degradación del LBD-RE, solo o en quimera, cuando se expresa en *E coli* BL21 (DE3) y se extrae en presencia de inhibidores de proteasa (Fechner et al. 2009; Dumbrepatil et al. 2010; Guo et al. 2013; Gurer-Orhan et al. 2005). Sin embargo se sabe que el RE tiene sitios sensibles a proteasas, uno de ellos comprende de la K299 a la K303 y el otro de la T465 a la S468 (D. A. Seielstad et al. 1995; Donald A. Seielstad et al. 1995). Debido a que la quimera se expresó a partir del aminoácido K302 el primer sitio sensible a proteasas se descarta. Además, debido a que no se observan bandas a pesos moleculares menores de 55 kDa y mayores de 30 kDa y que presenten fluorescencia, se piensa que la degradación es específica. En el caso de que no lo fuera se observarían y retendrían en la columna una mezcla de fragmentos fluorescentes.

Por tanto, se buscaron los tipos de proteasas que pudiesen digerir en la región que comprenden los 8 aminoácidos conservados del C-terminal de las PF, el conector y los aminoácidos del K302 al A350 del LBD del RE, con el propósito de analizar el tipo de inhibidor a utilizar o si los que se utilizan no inhiben a cierto tipo de proteasas. Para el análisis *in silico* se utilizó el programa en línea PROSPER (PROtease Specificity Prediction

ServER). PROSPER predice sitios de corte para 24 diferentes familias de proteasas al analizar la secuencia primaria de la proteína. El programa toma en cuenta los modelos de la estructura secundaria derivados de la secuencia primaria, la accesibilidad del solvente y su desorden intrínseco, para predecir de forma certera los sitios de hidrólisis enzimática.

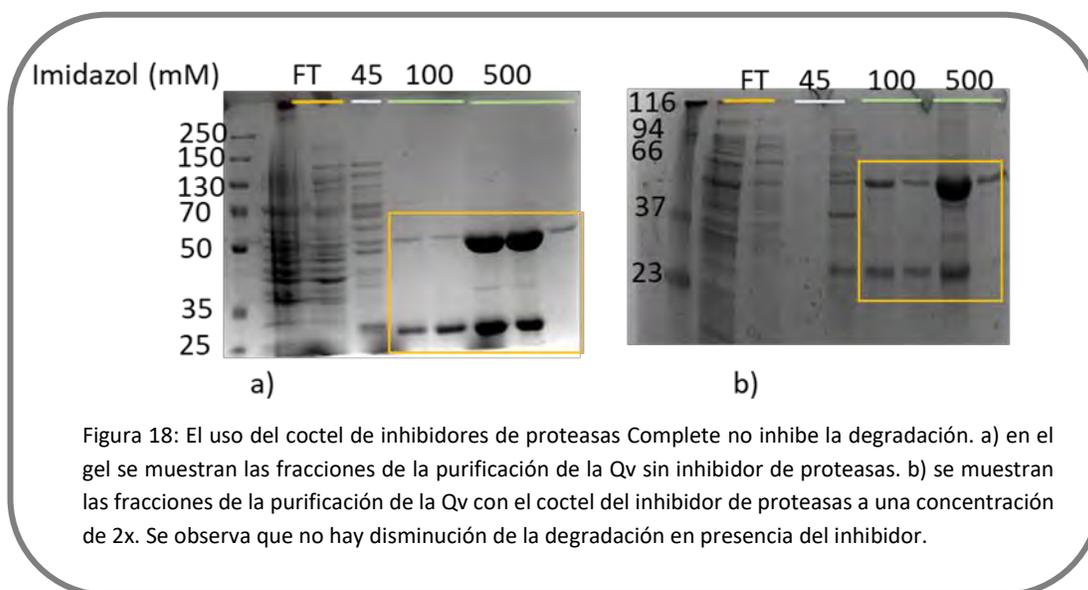
En la Figura 17 se muestra la secuencia y los resultados del análisis:



Se puede observar que hay 18 sitios en el LBD-RE (recuadro rosa), dos sitios de corte en el C-terminal de las PF (recuadro verde), y un sitio en el conector (recuadro azul). Se ha visto que el LBD-RE tiene un núcleo estructural que es insensible a proteasas, los sitios de corte están protegidos por su estructura terciaria, y sólo la desnaturalización parcial del LBD induce su hidrólisis de LBD (D. A. Seielstad, K.E. Carlson, P. J. Kushner, G.L. Greene 1995). Esto implica que, si estuviera plegado el LBD del RE, los 18 sitios están protegidos, en caso de no estarlo se esperaría una degradación en esa zona. Por otro lado, el C-terminal (GMDELYK) de las proteínas fluorescentes y el inicio del conector flexible, están flanqueados por tres sitios de corte como se observa en la Figura 17, uno para metaloproteasas, otro para un aspartato proteasas y finalmente un sitio para serina proteasas. En el caso de la metaloproteasa la adición de EDTA puede inhibir su actividad. El sitio de corte para la metionina del N-terminal de las PF se descarta ya que a pesar de que se han encontrado genes que codifican a posibles aspartato proteasas (Hill & Phylip 1997) en bacterias no se han logrado aislar sin ser sobreexpresadas. Además, el inhibidor Complete® + EDTA es capaz de inhibir eficientemente a las proteasas de *E coli* (*The Complete guide for protease inhibition*), incluyendo las metaloproteasas y las serín proteasas. Cabe mencionar que *in vivo* el 90% de la actividad proteolítica en el citoplasma

de *E. coli* es dependiente de ATP y es para remover proteínas dañadas o mal plegadas. Caso contrario sucede *in vitro* en donde las proteasas no son dependientes de ATP por lo que todas las proteasas *in vitro* tienen actividad. En el caso de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) se espera que la actividad proteolítica sea baja debido a que fueron deletados los genes que codifican a las proteasas Lon y Clp. Las proteasas Lon y Clp llevan a cabo el 70% de la actividad proteolítica en *E. coli* (Maurizi 1992), y proteasa OmpT, es la principal enzima proteolítica responsable de la degradación de proteínas heterólogas (Maurizi 1992).

Con el objetivo de observar si el inhibidor Complete® + EDTA era capaz de inhibir la degradación de las quimeras se añadió al extracto. Sin embargo, la adición del inhibidor no previene la degradación de las quimeras (Figura 18). Lo que indica que la degradación durante el proceso de purificación no es debida a proteasas. Pudiese ser que la degradación suceda durante la sobreproducción de la proteína en *E. coli* debido a que la quimera se encuentre desplegada y se degrade por proteólisis dependiente de ATP.



Basándonos en estas consideraciones y nuestros resultados, es poco probable el mecanismo de la degradación durante la purificación sea debido a proteasas.

Por otro lado, después de purificar las quimeras (se obtuvo una banda intensa de alrededor de 55 KDa) se encontró que, al almacenarlas a 4 °C, las quimeras se degradaban, lo que sugiere de la quimera podría degradarse de forma espontánea. Como se observa en la Figura 19, la Qr que fue purificada a homogeneidad por IMAC y DEAE se encuentra hidrolizada después de almacenarse 8 días a 4 °C en amortiguador de fosfatos pH 7.4. Este fenómeno también se observa cuando se añade 10 mM de β -mercaptoetanol y 10% de

glicerol. El agente reductor y el glicerol se adicionaron debido a que en todas las referencias en donde se purifica el LBD, estos compuestos se adicionan (Dumbrepatil et al. 2010; Tamrazi et al. 2002; D. A. Seielstad et al. 1995; Eiler et al. 2001). El glicerol ayuda a compactar a las proteínas debido a que se une a las regiones hidrófobas, esto se resume en una estabilización de la estructura terciaria (Vagenende et al. 2009). El β -mercaptoetanol ayuda a inhibir la oxidación de las cisteínas del LBD. Aun con la adición de estos compuestos la degradación persistió. Después de varias pruebas con glicerol, se encontró que las quimeras son estables cuando se almacenan en amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4 y 50 % de glicerol en el congelador. En estas condiciones las quimeras se mantienen estables por más de un mes (ver Figura 20).

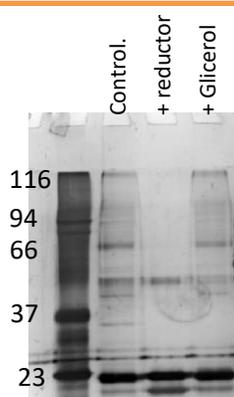


Figura 19. Qr después de almacenar a 4 °C por 8 días. Carril 1: Control: Qr en buffer fosfatos 10 mM pH 7.4. Carril 2: + reductor (10mM de β -mercaptoetanol); Carril 3: + glicerol: (10% glicerol).

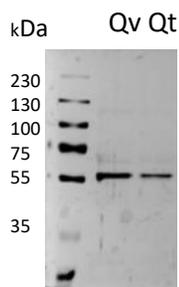


Figura 20: Gel SDS-PAGE de la estabilidad de la Qv y la Qt en glicerol al 50% y a -20 °C. Gel con 10% de acrilamida.

En este trabajo se encontraron las condiciones para almacenar a las quimeras del LBD con proteínas fluorescentes por más de un mes. Sin embargo, debido a que es importante conocer en donde ocurre la degradación, se pretende averiguar si el LBD está intacto, con el propósito de corroborar que solo se degrada en una región en específico. Para ello se pretende purificar el LBD para secuenciar el N-terminal con el objetivo de encontrar el sitio de corte y en el caso de ser un solo sitio, generar una mutante que genere una quimera insensible a la proteólisis. En el caso que la quimera se degrade por la inestabilidad del LBD y que este sea completamente degradado, se generarían mutantes para disminuir su inestabilidad.

8.6 Solubilidad de las quimeras: más señales de que forman oligómeros

Otro problema con el que nos enfrentamos fue la solubilidad de las quimeras puras (quimera sin el fragmento fluorescente de 25kDa), debido a que, se encontró que durante la ultrafiltración y la diálisis del NaCl la quimera precipitaba. Por lo que decidimos investigar las condiciones a las cuales las quimeras no precipitaban y

en el caso del precipitado, si este es un agregado insoluble o si forma oligómeros precipitados que podrían ser solubilizados.

Debido a que al ultrafiltrar las quimeras siempre precipitaban se decidió dializar el NaCl de las quimeras para evitar la precipitación, sin embargo, aun al dializar las quimeras precipitaban. No obstante, después de la precipitación el sobrenadante se mantenía colorido por lo que se decidió diluir las quimeras para evitar la precipitación durante la diálisis. Después de diluir las quimeras se encontró que la diálisis del NaCl inducía la precipitación de las quimeras a concentraciones mayores de aproximadamente 70 $\mu\text{g/mL}$ para la Qr y aproximadamente 400 $\mu\text{g/mL}$ para Qt, Qv y Qc. Por lo que se decidió utilizar concentraciones menores o iguales para dializar a las quimeras. El hecho de que precipiten al eliminar el NaCl nos sugiere que la quimera podría presentar puentes salinos. Para entrar en contexto el NaCl es un cosmotrópo débil que aumenta las interacciones H₂O-ion e ion-residuo, lo que aumenta la solubilidad de la proteína, por lo que al eliminar el NaCl, podrían promoverse las interacciones residuo-residuo que provocan la precipitación. Para corroborar esta hipótesis se trató de solubilizar el precipitado de la Qc al adicionar una solución de NaCl 1 M. La adición de la solución no promovió la solubilidad del precipitado de forma importante ya que sólo se alcanzó una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado podría deberse a que se forman al precipitarse interacciones hidrófobas que son más fuertes que las interacciones ion-residuo y por tal motivo se observa poca solubilidad después de adicionar NaCl. La poca solubilidad del precipitado con NaCl nos llevó a probar otros agentes para solubilizar a las quimeras como son el Tween 20, el Triton X-100 y el imidazol.

La presencia de 0.02% de Tritón X-100 permitió trabajar a concentraciones mayores, por ejemplo, para Qc, se alcanzó una concentración de aproximadamente 700 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado sugiere que los detergentes podrían unirse a las regiones hidrófobas del LBD y evitar la precipitación a concentraciones mayores de 400 $\mu\text{g/mL}$, pero al estar muy concentradas las quimeras siguen precipitando. Por otro lado, se intentó solubilizar el precipitado con Tween 20, y se encontró que a concentraciones de 120 μM solo se logró solubilizar 15 $\mu\text{g/mL}$. Se ha observado que la solubilidad de las proteínas aumenta en presencia de detergentes cuando su concentración está por arriba de la concentración micelar crítica (CMC) (Tsumoto, Ejima, Kumagai, & Arakawa, 2003). La concentración a la que se utilizó el Tween 20 es 2 veces mayor que la CMC, por lo que se esperaba que se solubilizaran las proteínas. Debido a que Tween 20 un detergente débil que no puede competir con las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína (Seddon, Curnow, & Booth,

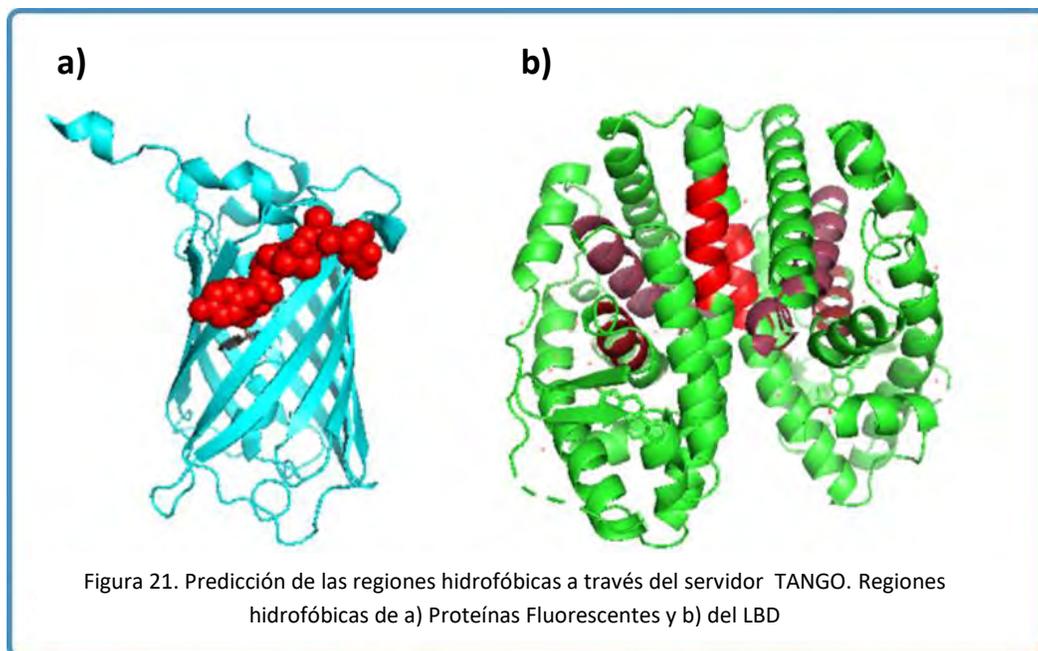
2004), se piensa que la quimera al precipita porque estos detergentes no son capaces de competir con la formación de interacciones proteína-proteína entre los parches hidrofóbicos de las quimeras. Profundizando en este problema, el precipitado de Qc se intentó solubilizar con imidazol, debido a que se ha visto que la etiqueta de 6xHis puede estar implicada en la formación de oligómeros (Wu & Filutowicz, 1999). Lo máximo que se logró solubilizar con 500 mM de imidazol fueron 90 µg/mL, 4.5 veces menos que la concentración a la que es soluble Qc, Qv y Qt. Hamilton S., et al 2003, encontraron que la etiqueta de 6xHis, así como histidinas de la propia proteína podrían promover la precipitación por interacciones aromáticas entre histidinas, el imidazol compite por esas interacciones reduciendo las interacciones His-His, de forma que promueve la solubilidad. Por tanto, probablemente el 6xHis tag esté implicado en cierto grado en la precipitación de las quimeras debido a que ésta se da cuando se elimina el imidazol por diálisis. Esto concuerda porque la eliminación de imidazol de la mezcla de proteínas purificadas por IMAC cuando están muy concentradas también provoca la precipitación. La incapacidad de solubilizar a las quimeras nos indica que se trata de un agregado.

Se ha propuesto que la agregación del RE se puede seguir tres mecanismos, como se han propuesto: (1) la formación de intermediarios desnaturalizados, (2) la agregación a través auto asociación entre proteínas en estado nativo (puentes salinos, o de interacciones hidrofóbicas), o por unión química, y (3) por degradación química (Wang, Nema, & Teagarden, 2010). La agregación a través de intermediarios se debe a la exposición de residuos hidrofóbicos. Esta característica hace que los intermediarios se conviertan en núcleos de agregación que posteriormente precipitan. La agregación a través de la auto asociación de proteínas en estado nativo se debe a interacciones electroestáticas o interacciones electroestáticas e hidrofóbicas. La agregación puede estar o no acompañada de cambios conformacionales de las proteínas. La asociación tiende a entrar entre un equilibrio reversible de oligómeros/agregados que son los precursores de los agregados insolubles. La agregación por unión química más reconocida es la formación de puentes disulfuro, aunque se pueden dar otros tipos de unión química como son la formación de ditirosinas o reacciones de Maillard. Por último, agregación inducida por la degradación química de la proteína se puede dar por la oxidación, deamidación e hidrólisis de la proteína. Es importante conocer la causa de la agregación de la proteína antes de diseñar estrategias para prevenirla o inhibirla.

La expresión del LBD en E. coli genera cuerpos de inclusión que son solubilizados con ayuda agentes caotrópicos como la urea y detergentes o evitados por la adición de E2

(Eiler, Gangloff, Duclaud, Moras, & Ruff, 2001). En estas condiciones se han alcanzado concentraciones mayores a 10 mg/mL. En cuanto estado oligomérico al LBD se ha encontrado como una mezcla entre monómero y dímero (Eiler et al., 2001). En nuestro caso el uso de E2 para estabilizar a la quimera no es una opción, ya que se pretenden analizar muestras de PE con menor afinidad al estradiol, que no podrían competir por el sitio de unión.

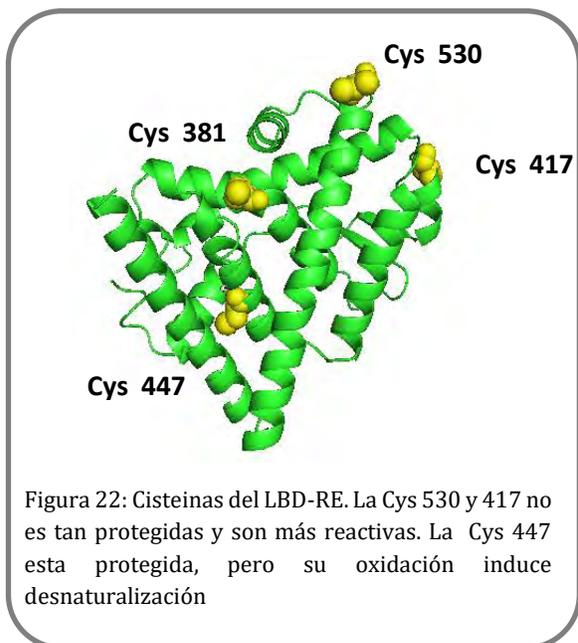
Una de las razones por las que estas construcciones pudieran ser poco solubles es la propia naturaleza insoluble del fragmento LBD. El receptor de estrógeno tiene cuatro regiones con propensión a agregarse, como se observa en la Figura 21, y la mayoría de estas regiones está protegida cuando el ligando se encuentra unido al receptor. Además, a altas concentraciones las PF precipitan, ya que también tienen una pequeña región con propensión a agregarse (Figura 21). Y en el caso de la Qr, mRuby2 tiende a agregarse en el ensayo OSER (Bindels et al., 2016), que es una prueba en donde se unen las PF una proteína transmembranal del retículo endoplásmico, la formación de oligómeros por parte de las PF, genera un cambio estructural en el retículo endoplásmico que puede ser detectado por microscopio. Debido a que mRuby2 induce un cambio estructural en el ensayo OSER, se espera que su solubilidad de la Qr sea baja.



Debido a que la diálisis de NaCl genera un precipitado y una fracción soluble, y que, la adición de agentes caotrópicos son capaces de solubilizar escasamente al precipitado, pero no la adición de amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4 (10 µg/mL), se piensa que el mecanismo de formación de los agregados podría ser a través de la formación de

intermediarios desnaturalizados o a través de la formación de un equilibrio oligómeros /agregados que forman finalmente agregados insolubles. Para confirmar esta hipótesis se podrían hacer experimentos de anisotropía para averiguar la cantidad de hélices alfa, beta y regiones sin estructura del agregado y de la fracción soluble, como lo reportaron con la β -lactoglobulina (Carrotta et al. 2001). Otro mecanismo de agregación es a través de la unión química de las proteínas, principalmente por la formación de puentes disulfuro. El LBD-RE tiene cuatro cisteínas la Cys 381, la Cys 417, la Cys 447 y la Cys 530 como se observa en la Figura 22. Las C381 y C447 se encuentran en el núcleo del LBD, mientras que las C417 y C530 se encuentran expuestas. Se ha observado que las C381 y C530 son sensibles a oxidación, siendo la última la más sensible (Hegy, Shackleton, & Witkowska, 1996). Por lo tanto, podría ser que la agregación y precipitación también se podría deber a la formación de puentes disulfuros entre LBD-RE. Hay que hacer notar que estos residuos se encuentran en el lado contrario del N-terminal donde se encuentra la PF, por lo que no podrían estar protegidos por la PF. La adición de agentes reductores como β -mercaptoetanol y ditioneitol antes la purificación en Ni-NTA se ha evitado ya que reducen al Ni (II). Una alternativa es aumentar el pH para disminuir la reducción del Ni (II). Para corroborar si se forman o no agregados por formación de puentes disulfuros se propone hacer SDS-PAGE de los agregados sin incubarlos con β -mercaptoetanol, en caso de formarse puentes disulfuro se observarían bandas de alto peso molecular. En el caso de la formación de agregados por degradación y unión química por la formación de dímeros de tirosina, reacciones de Maillard y oxidación, y para corroborar este mecanismo se harían geles SDS-PAGE de los precipitados y se esperarían observar varias bandas en los geles.

Por otro lado la fusión del LBD del RE con PF evitan la formación de cuerpos de inclusión, por ejemplo la quimera Turquesa-LBD-Venus, que funciona como un sensor FRET para perturbadores endocrinos, puede concentrarse hasta 20 mg/mL (Dumbrepatil et al., 2010)



sin la adición de estradiol o el uso de agentes caotrópicos para obtenerlos solubles y en su forma nativa, lo que sugiere que la fusión de las proteínas fluorescentes mejoran la solubilidad del LBD-RE y que el LBD es capaz de unir al ligando. Aunque se sabe que aun a 5 M de urea el LBD es capaz de unir al E2 (Seielstad, Carlson, Kushner, Greene, & Katzenellenbogen, 1995) por lo que la unión del ligando no podría ser un indicativo del estado nativo del LBD. En nuestro caso la unión de una proteína

fluorescente mejoró la solubilidad.

Gracias a la fusión de la proteína fluorescente al LBD, las quimeras presentan solubilidad, en comparación el LBD del RE, que solo es soluble después de la solubilización con agentes caotrópicos o la adición de E2. No obstante, esta solubilidad es limitada y es menor en la Qr, en comparación de las Qv, Qc y Qt. Para evitar la agregación de las quimeras se decidió diluir a las quimeras a concentraciones iguales o menores de su límite de solubilidad y dializarlas. Se decidió utilizar solamente las quimeras Qc y Qt, ya que la Qr tenía muy poca solubilidad y no permitía obtener resultados en la fluorescencia. Para incrementar la solubilidad de las quimeras se propone indagar en el mecanismo de agregación, para proponer una metodología, como la adición de glicerol y detergentes para mantener el estado plegado, la adición de sales para evitar la formación de oligómeros por interacciones electrostáticas y mantener un ambiente reducido para evitar la formación de puentes disulfuro.

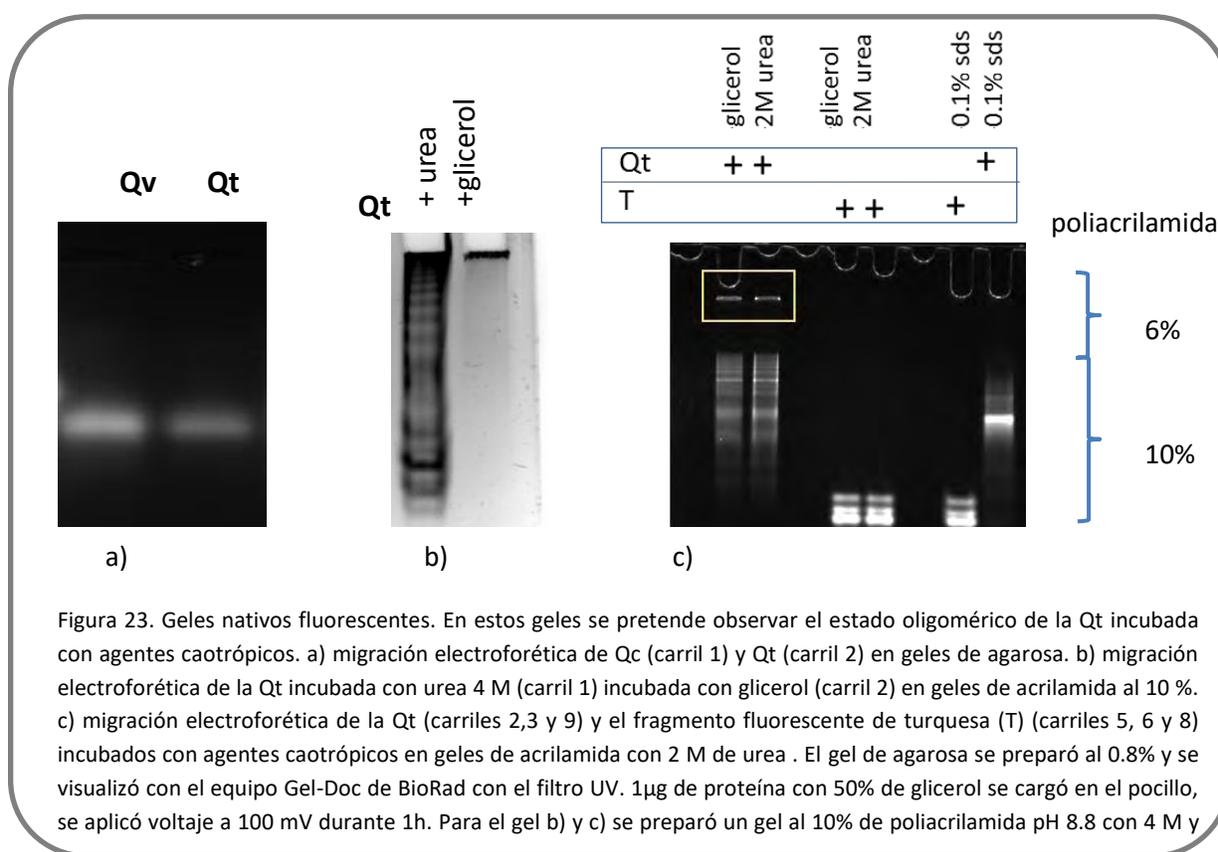
8.7 Las quimeras podrían formar oligómeros

Una aproximación sencilla para observar el estado oligomérico de las proteínas es a través de la electroforesis en geles nativos, en donde la propia carga y tamaño de la proteína

definen la migración de la misma. Por tal razón se hicieron experimentos de electroforesis en gel de quimeras puras para observar su estado oligomérico.

Se ha observado que en geles de poliacrilamida que se pueden diferenciar estados oligoméricos con ayuda de colorantes que ayudan a cargar negativamente a la proteína en condiciones nativas (pH 7) (Dráb et al. 2011). Sin embargo, se esperaría que a pH 8 las quimeras están cargadas negativamente, ya que su pI teórico es de alrededor de 6.4. Por tal motivo se decidió utilizar este pH para separar los oligómeros en geles nativos. No obstante que la fluorescencia de la wt-GFP es estable dentro del intervalo de pH de 6-10 (Campbell & Choy 2001; Saeed & Ashraf 2009), poco se conoce la estabilidad del LBD-RE a ese pH. Por tal motivo se hizo un gel nativo de agarosa (0.8%) para determinar la movilidad electroforética y la estabilidad de fluorescencia de las quimeras Qv y Qt. Como se observa en la Figura 22a, las quimeras cargadas negativamente migran al ánodo y se lograron excitar a 365 nm con el equipo GEL-DOC de Biorad, lo que implica que las quimeras aún fluorescen a pH 8. A pesar de la migración de las quimeras en geles de agarosa (ver Figura 23a), la Qt se queda retenida en el pocillo de los geles de poliacrilamida al 10% (ver Figura 22b). Este resultado sugiere que la quimera se encuentra como un agregado de alto peso molecular. La migración de la Qt hacia el ánodo solo se observa parcialmente si se adiciona urea. La quimera migra al ánodo en una serie de bandas (ver Figura 23b). Para observar la migración de la quimera se realizó un gel con 2 concentraciones de poliacrilamida, una región de 6% y otra del 10%, como se observa en la Figura 23c. En el recuadro amarillo de la Figura 23c se observa que aún a concentraciones de 6% de poliacrilamida una fracción de la quimera queda retenida en el pocillo, y que al comenzar el gel al 10% de poliacrilamida, se observa un barrido fluorescente con ciertas bandas definidas de la quimera. Posiblemente las quimeras formen agregados de alto peso molecular que son parcialmente desensamblados por la urea. Debido a que el SDS logra estabilizar la intensidad de fluorescencia de las quimeras (como se observa en la Figura 23) y compite por las interacciones hidrofóbicas proteína-proteína se decidió utilizarlo para desagregar a las quimeras. Como se observa en la Figura 20c, la adición de 0.1% de SDS logró formar una sola banda intensa, lo que indica que se forma un solo oligómero. Debido a que se observan bandas fluorescentes debajo de la banda intensa, se infiere que probablemente esta banda intensa no es un monómero. Es importante resaltar que el gel fue revelado por fluorescencia, por lo que se descarta que los cambios observados sean debido a que la proteína se desnaturizó completamente al añadir SDS o urea. Se tiene esta hipótesis debido a que las bandas siguen floreciendo,

indicativo de que al menos la PF tiene estructura y a que el LBD es capaz de unir a 5 M de urea si no tuviese el sitio de unión al ligando. La desnaturalización provocaría la pérdida de este sitio y la unión del ligando. Por lo que se piensa que aun a estas condiciones el LBD de la quimera tiene estructura, para corroborar esto, se podrían realizar experimentos de anisotropía. Posteriores estudios como dispersión dinámica de luz o cromatografía de permeación en gel podrían proporcionar un estimado del peso molecular del oligómero con diferentes agentes caotrópicos. Para observar los efectos que tienen los agentes caotrópicos en la PF, se decidió usar al fragmento fluorescente como control. Se observa que en la Figura 23c (recuadro blanco), no se observan diferencias entre las fracciones fluorescentes con glicerol, urea y SDS.



8.8 Estabilidad de la fluorescencia de las quimeras en presencia de agentes caotrópicos

Se pretendió adicionar agentes caotrópicos a las quimeras para favorecer que las la formación monómeros y así evitar el FRET basal (ruido) dado por la oligomerización en ausencia de ligando. Debido a que los agentes caotrópicos como la urea y los detergentes son capaces de desnaturalizar a las proteínas, realizamos experimentos para observar si las quimeras perdían intensidad fluorescencia al estar con estos agentes, ya que la pérdida de la fluorescencia nos indicaría la pérdida de la estructura de la PF. Para nuestra sorpresa, nuestro control, es decir la quimera en ausencia de agentes caotrópicos, perdía fluorescencia con el tiempo. Para observar la estabilidad de la intensidad de la fluorescencia (IF) de la emisión de la quimera turquesa (Qt), se incubó la quimera en amortiguador de fosfatos a 25 °C durante 4h y en ausencia de luz. Como se observa en la Figura 21, en 4h se pierde alrededor del 50 % de la IF y se mantiene hasta las 24h, cuando también tiene una IF relativa de aproximadamente 50%. Para probar si este efecto es debido al fotoblanqueo se incubaron las quimeras en ausencia de luz. Aun en ausencia de luz se presentó el mismo fenómeno, lo que indica que la pérdida de la IF no es debida al fotoblanqueo.

El tiempo de incubación se eligió debido a que el LBD-RE une el 90% de E2 en 4h (D. A. Seielstad et al. 1995). Se utilizó una concentración de 2 M de urea, ya que permite disminuir la dimerización basal del LBD *in vitro*, y además se sabe que a concentraciones menores de 4 M de urea las mutantes de la GFP son estables (Pédelaq et al. 2006) y el LBD es capaz de unir estradiol, incluso a 5 M de urea (D. A. Seielstad et al. 1995).

Se realizó un gel SDS-PAGE para comprobar si las quimeras se estaban degradando y por tanto esa fuera la razón de la pérdida de la fluorescencia. Sin embargo, a las 12 h se observó que las quimeras siguen estando presentes (ver Figura 23b).

Debido a que se busca disminuir la dimerización basal de las quimeras también se evaluó la estabilidad de la IF de la emisión de la Qt a urea 2M. Como se observa en la Figura 24a con 2 M de urea la señal no es estable y disminuye a las 4 h. La disminución de la IF en presencia de urea es similar a la disminución de la IF sin

urea, lo que sugiere que la quimera no se desnaturaliza con 2M de urea. Como se mencionó antes, hay cierta propensión del LBD a oxidarse, por lo que se adicionó β -mercaptoetanol para observar si la disminución de la IF estaba relacionada con la oxidación de las quimeras. Como se observa en la Figura 24b, el agente reductor no reduce la pérdida de la fluorescencia.

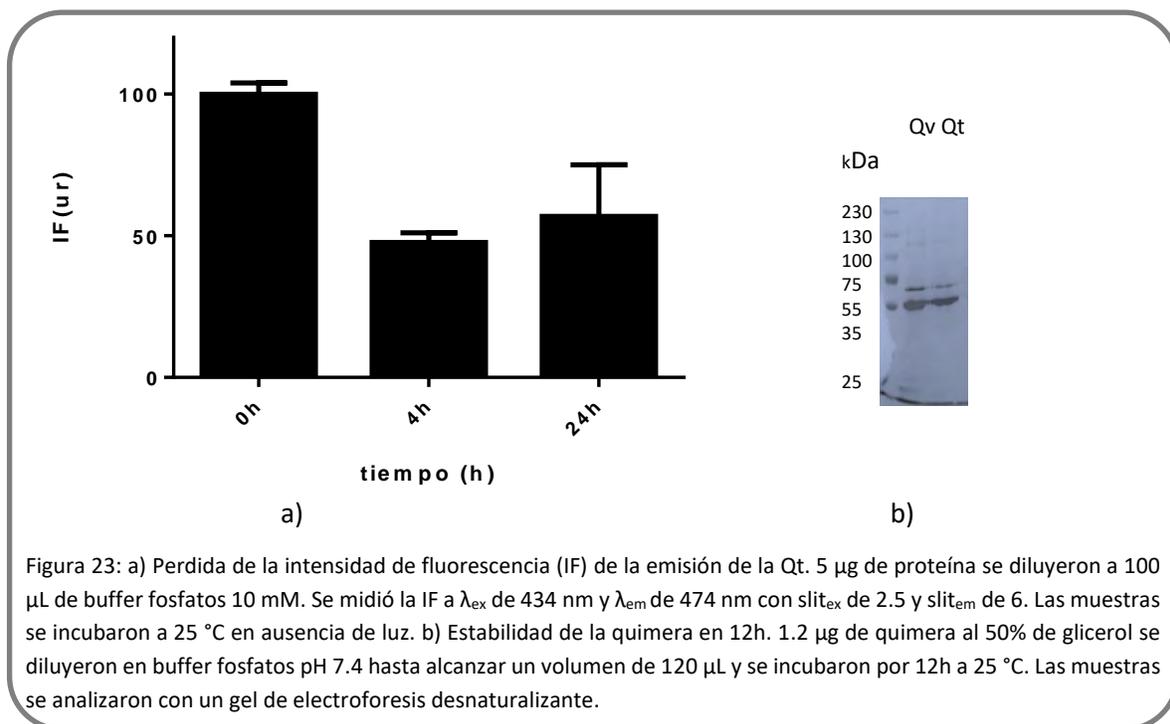


Figura 23: a) Pérdida de la intensidad de fluorescencia (IF) de la emisión de la Qt. 5 μ g de proteína se diluyeron a 100 μ L de buffer fosfatos 10 mM. Se midió la IF a λ_{ex} de 434 nm y λ_{em} de 474 nm con $slit_{ex}$ de 2.5 y $slit_{em}$ de 6. Las muestras se incubaron a 25 °C en ausencia de luz. b) Estabilidad de la quimera en 12h. 1.2 μ g de quimera al 50% de glicerol se diluyeron en buffer fosfatos pH 7.4 hasta alcanzar un volumen de 120 μ L y se incubaron por 12h a 25 °C. Las muestras se analizaron con un gel de electroforesis desnaturizante.

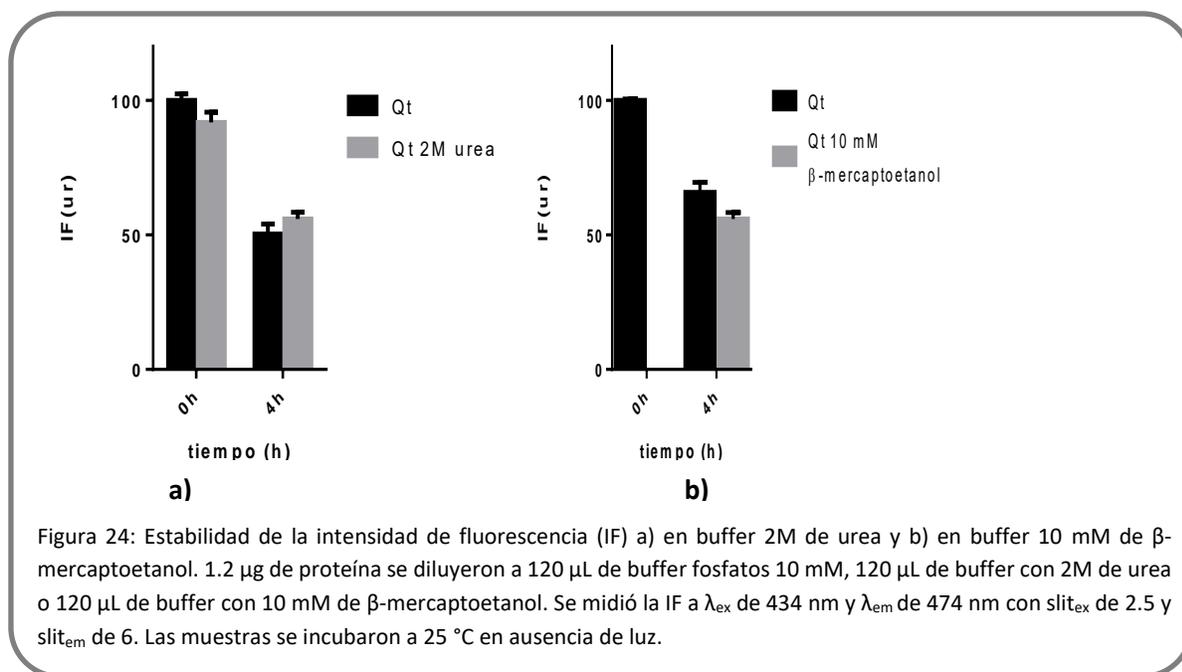
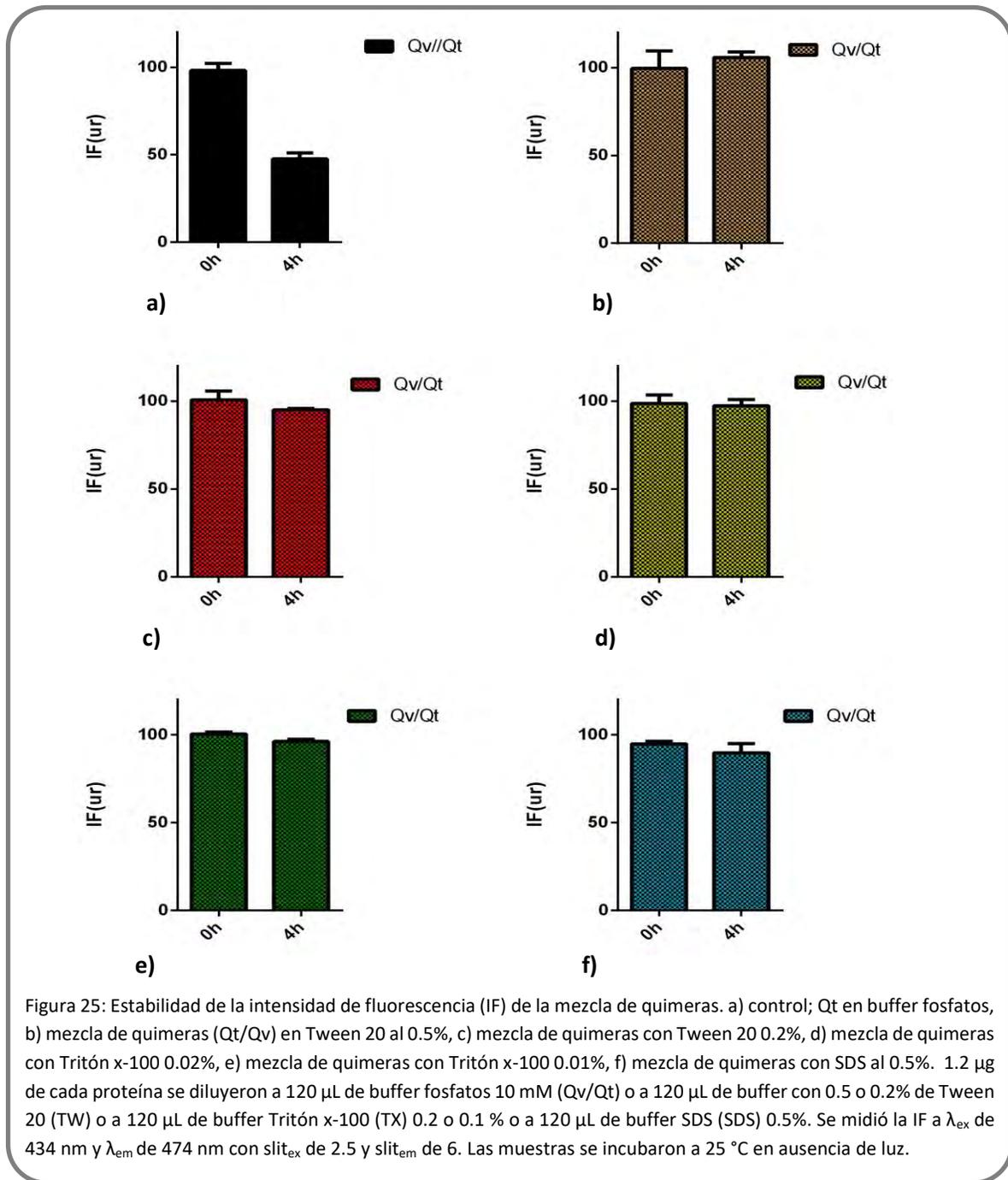


Figura 24: Estabilidad de la intensidad de fluorescencia (IF) a) en buffer 2M de urea y b) en buffer 10 mM de β -mercaptoetanol. 1.2 μ g de proteína se diluyeron a 120 μ L de buffer fosfatos 10 mM, 120 μ L de buffer con 2M de urea o 120 μ L de buffer con 10 mM de β -mercaptoetanol. Se midió la IF a λ_{ex} de 434 nm y λ_{em} de 474 nm con $slit_{ex}$ de 2.5 y $slit_{em}$ de 6. Las muestras se incubaron a 25 °C en ausencia de luz.

En un experimento alternativo se intentó evaluar si las quimeras en presencia de detergentes eran capaces de dimerizar y observar un fenómeno FRET, para nuestra sorpresa, las quimeras no pierden considerablemente la IF de la emisión de la Qt cuando está en presencia de un detergente no iónico como el Tritón X-100 o el Tween 20 a concentraciones de 0.02% y 0.5% respectivamente durante 4 h (ver Figura 25).



El Tritón X-100 es un detergente no iónico que a bajas concentraciones (<0.32%), no es capaz de desnaturalizar proteínas (De et al. 2005). El mecanismo de acción del detergente es a través de su unión inespecífica a los parches hidrofóbicos de las proteínas. La unión inespecífica y no cooperativa de estos surfactantes promueven el incremento de la velocidad de plegamiento, aumenta la energía libre de desnaturalización y disminuye la velocidad de agregación (Chi et al. 2003); por lo que se considera que se comportan como chaperonas químicas. Probablemente por alguno de estos mecanismos no se pierde la fluorescencia de las quimeras. Sin embargo, se necesitan más experimentos para entender la razón de la pérdida de la intensidad de fluorescencia.

8.9 No hay transferencia de energía Förster por resonancia con 2 M de urea

La transferencia de energía Förster por resonancia se presenta cuando hay una distancia menor a 0.1 nm y cuando el espectro de emisión de la proteína donadora (Q_t) y el espectro de excitación de la proteína aceptora (Q_v) se superponen, la intensidad de fluorescencia (IF) del espectro de emisión de la proteína donadora disminuye y aumenta el espectro de emisión de la proteína aceptora. Por tanto, se puede medir la disminución de la intensidad del máximo de emisión de la proteína donadora o el aumento en la intensidad del máximo de emisión de la proteína aceptora. Por las características del LBD del RE la quimera se espera que se encuentre como dímero y se espera que al mezclar las quimeras se encuentren en la mezcla 50% de homodímeros (25% de Q_v/Q_v , 25%, Q_t/Q_t) y 50% de heterodímeros (Q_t/Q_v). Los dos primeros tipos de dimerización son improductivos en cuanto a FRET. Por tanto, se estima que, si la eficiencia FRET fuera del 100% la intensidad de fluorescencia del máximo de emisión del donador disminuiría como máximo, a la mitad de su valor total.

Se encontró que la mezcla de quimeras (Q_t y Q_v) no presentan FRET en presencia de 2 M de urea, 0.02% de tritón X-100. En estas condiciones la ausencia o presencia de estradiol no provoca un decremento en la IF del máximo de emisión de la Q_t , en comparación con el control (ver Figura 26).

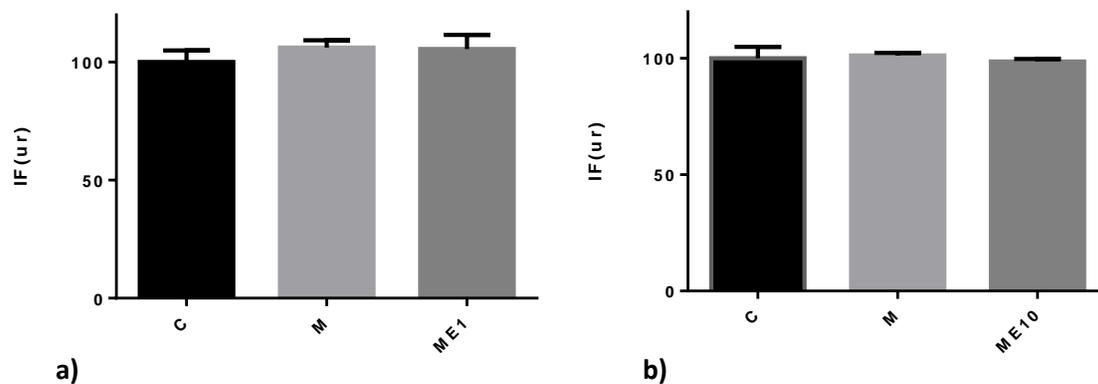


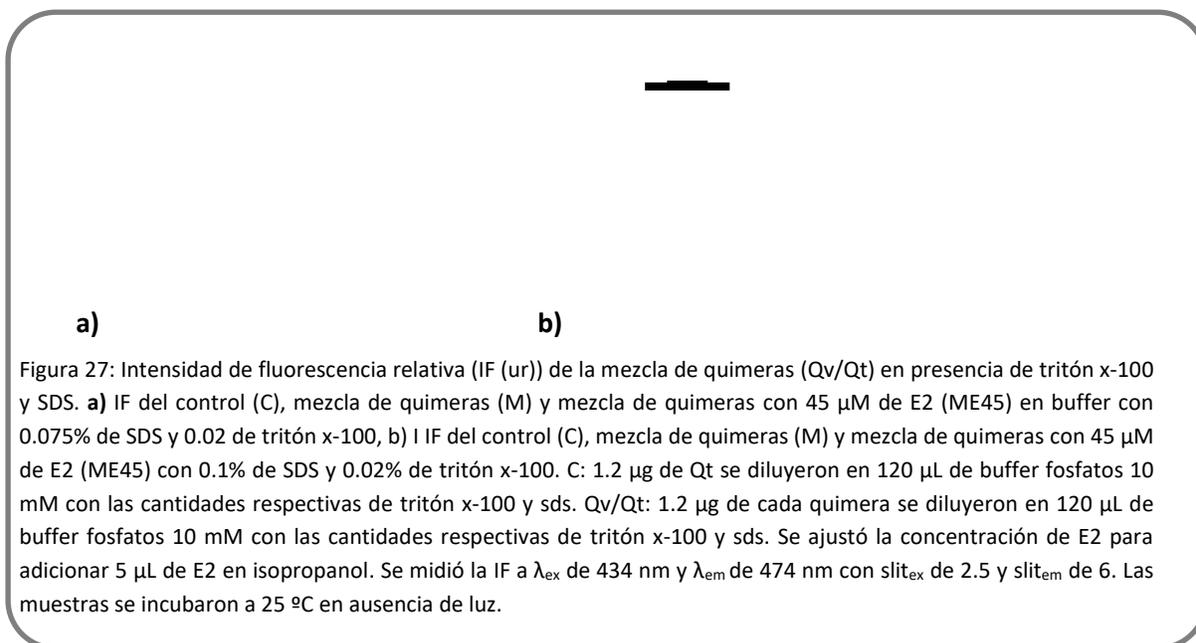
Figura 26: Intensidad de fluorescencia relativa (IF (ur)) del par FRET en presencia de Tritón x-100 y urea 2M, a dos concentraciones de E2: 1 y 10 μ M. a) IF del control(C), mezcla de quimeras (M) y la mezcla de quimeras con 1 μ M de E2 (ME1), b) IF del control (C), mezcla de quimeras (M) y la mezcla de quimeras con 10 μ M de E2 (ME10). C: 1.2 μ g de Qt se diluyeron a 120 μ L de buffer fosfatos 10 mM con 0.2% de Tritón x-100 y 2 M de urea. M: 1.2 μ g de cada quimera (Qv y Qt) se diluyeron a 120 μ L de buffer fosfatos 10 mM con 0.2% de Tritón x-100 y 2 M de urea. Se ajustó la concentración de E2 para adicionar 5 μ L de E2 en isopropanol en las muestras ME. Se midió la IF a λ_{ex} de 434 nm y λ_{em} de 474 nm con $slit_{ex}$ de 2.5 y $slit_{em}$ de 6. Las muestras se incubaron a 25 $^{\circ}$ C en ausencia de luz.

Estos resultados indican que no se está dando la transferencia de energía entre las quimeras. Ya sea porque no hay intercambio entre las quimeras; o bien porque se encuentran como oligómeros y, por tanto, no hay un intercambio efectivo o, si lo hay, las quimeras no conforman un par FRET eficiente. Otra forma de determinar si hay agregados que no forman heterodímeros podría ser cuantificando el homoFRET de la proteína Qv (Nguyen et al. 2012).

8.10 El SDS podría fomentar la dimerización

El SDS es un agente desnaturizante fuerte ampliamente utilizado para desnaturizar a las proteínas o solubilizar, con cierto grado de desnaturización, a las proteínas de membrana. A pesar de sus características desnaturizantes, también tiene efectos positivos, como se observó al estabilizar la IF de las quimeras. Además, ayuda a desensamblar oligómeros de alto peso molecular, como se observa en la Figura 20c. Por tal motivo se midió la IF de las quimeras con una mezcla de detergentes, SDS y Tritón X-100. En la mezcla de 0.02% de Tritón X-100 y 0.75% de SDS se observó una pequeña disminución en la IF de la emisión de la Qt de la mezcla de quimeras (M) en comparación con el control (ver Figura 27a). La disminución de la IF de la emisión de la Qt podría indicar que a esta concentración hay formación de heterodímeros, ya que parte de esa energía de emisión se transfiere a la Qv. Este mismo fenómeno se observa cuando el SDS está a una concentración de 0.1% con 0.02% de Tritón X-100 (ver Figura 27b). La disminución de la IF

de la mezcla de quimeras cuando no hay estradiol podría indicar que a estas concentraciones de SDS, no se forman monómeros completamente. De ser así, no se cuantificaría en la mezcla de quimeras una disminución de la IF de la emisión de la Qt en ausencia de estradiol. Por lo que se sugiere, para evitar falsos positivos (Claude Berney & Danuser 2003), utilizar una mayor concentración de los agentes caotrópicos u otros cosolventes que ayuden a monomerizar a las quimeras, y que permitan una dimerización efectiva.



9 Conclusión

En este trabajo se pretendió desarrollar un método capaz de sensar a PE a través de una señal FRET. El método se basa en la heterodimerización dependiente de ligando de 2 quimeras que contienen al LBD como molécula sensora.

Para desarrollarlo se fusionó el LBD del receptor de estrógeno con dos pares FRET a través de un conector flexible. Para la expresión LBD del RE y evitar su agregación, es necesario la adición de estradiol. En nuestro trabajo las quimeras presentaron solubilidad sin la necesidad de la adición de estradiol, lo que indica que las proteínas fluorescentes ayudan a solubilizar al LBD del RE. Esto representa una ventaja ya que en caso de necesitar adicionar estradiol para solubilizar a las quimeras en pasos posteriores tendría que removerse para que fuera capaz de unir a PE con menor afinidad al estradiol.

A pesar de obtener a las quimeras solubles y brillantes las quimeras no son estables. Debido a que el inhibidor Complete® más EDTA no inhibe la degradación se cree que el

proceso de degradación de las quimeras presenta durante algún punto entre el proceso de expresión y extracción. Esta degradación genera una banda de alrededor de 25 kDa, las cuales presentan espectros de emisión de las PF, por lo que se trata de un fragmento de las quimeras. En este trabajo no se aisló el LBD del RE y no se tiene reporte de su integridad, pero se pretende aislar para determinar, en el caso de estar integro el LBD del RE, su secuencia de aminoácidos del N-terminal. En el caso de que se esté degradando en un sitio puntual, generar la mutante insensible a la degradación durante la expresión.

Las quimeras se pueden purificar en dos pasos, por purificación de afinidad a níquel y por intercambio aniónico. Las quimeras presentan límites de solubilidad, por arriba de esos límites forman agregados que son poco solubles. Para evitar la agregación se debe conocer el mecanismo por el cual agregan para proponer una metodología para solubilizarlos. Las quimeras puras también sufren degradación, la cual puede evitarse al conservar a las quimeras en glicerol al 50% y conservándolas a -20 °C.

Se intento comprobar la formación de dímeros por parte de las quimeras a través de geles nativos, pero se encontró que las quimeras forman oligómeros de alto peso molecular que no son capaces de entrar a los pocillos de geles de acrilamida al 6% pero si migrar en geles de agarosa al 0.8%. Estos oligómeros de alto peso molecular son parcialmente desensamblados por la adición de urea 2 M y completamente desensamblados con SDS al 0.1%.

Durante las pruebas de fluorescencia las quimeras pierden fluorescencia. Esta pérdida de la fluorescencia no está relacionada al fotoblanqueo ni a la degradación, lo que sugiere que es por pérdida de la estructura. La pérdida de la fluorescencia se puede evitar al adicionar agentes surfactantes débiles, estos ayudan a mantener la IF por más de 4 h. Estos agentes funcionan como chaperonas químicas que ayudan a mantener la estructura de las quimeras. Por lo que se usó el detergente Triton X-100 para estabilizar a las quimeras.

A pesar de que en otros experimentos la urea ayudo a disminuir la formación de dímeros entre el LBD y por tanto disminuir el FRET basal (ruido), en nuestro trabajo, la urea disminuye la formación de agregados, pero no se observó FRET. Lo que indica qué, o no hay heterodimerización o que las PF no se logran acercar eficientemente en estas condiciones.

Los experimentos FRET en presencia de SDS al 0.75% y Triton X-100 al 0.02% provocan, un descenso de la IF de la emisión de la Qt en la mezcla de quimeras. Esta disminución podría indicar que hubo FRET.

En este trabajo se encontró que las quimeras del LBD del RE con proteínas fluorescentes son poco estables ya que presentan degradación, son poco solubles y se agregan, finalmente pierden la fluorescencia con el tiempo. Sin embargo, se encontraron condiciones en donde las quimeras son estables y podrían presentar el fenómeno FRET en presencia de Triton X-100 y SDS.

10 Perspectivas

Debido a que es probable que la degradación de la quimera se de en una región cerca del conector, se pretende purificar al fragmento que contiene al LBD, producto de la degradación de la quimera y, determinar, a través de la secuenciación del N-terminal el sitio de degradación. Encontrar el sitio o sitios nos permitirá elegir la estrategia a seguir. Encontrar el sitio de degradación fuera del LBD, indicaría que se está degradando en el conector y la degradación se podría evitar al generar mutantes. Si la degradación es dentro del LBD, indicaría que la quimera pudiera estar desnaturalizada y que se degrada mientras esta en la bacteria, por lo que se propondría encontrar nuevas condiciones de expresión o la generación de mutantes que vuelvan más estable al LBD fusionado a las proteínas fluorescentes.

Una forma de observar si el LBD de las quimeras presenta algún grado de desnaturalización es a través de la digestión con proteasas, ya que las proteasas son capaces de degradar al LBD cuando esté esta desnaturalizado. El grado de desnaturalización se puede comprobar también con experimentos de dicroísmo circular, para observar la cantidad de hélices alfa, ya que el LBD del RE contienen 12 hélices alfa. Una disminución de la señal de estas hélices implicaría que el LBD se encuentra desnaturalizado.

Se pretende encontrar por dispersión dinámica de luz o cromatografía de exclusión molecular, el estado oligomérico de las quimeras en ausencia y en presencia de agentes caotrópicos. Para averiguar las condiciones en las que se forman los dímeros. En el caso de que se formen los dímeros y no se observe FRET, indicaría que las PF no se encuentran suficientemente cerca y/o que no se encuentran en la orientación óptima. Por tanto, se modificaría el conector (corto/largo/flexible/rígido) el cual es esencial para obtener un sistema que presente el fenómeno de FRET.

La poca solubilidad de las quimeras y el estado de agregación puede deberse a que el LBD- tiene una región hidrofóbica formada por las hélices 8 y 10. La solubilidad y el estado de agregación se podrían modificarse al introducir mutaciones de residuos hidrofóbicos a polares.

11 Bibliografía

- Aoki, K. et al., 2012. Stable expression of FRET biosensors: A new light in cancer research. *Cancer Science*, 103(4), pp.614–619.
- Ascenzi, P., Bocedi, A. & Marino, M., 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Molecular aspects of medicine*, 27(4), pp.299–402. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009829970600015X> [Accessed March 9, 2016].
- Bajar, B.T. et al., 2016. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 16(9). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27649177> [Accessed January 20, 2018].
- Bajar, B.T. et al., 2016. Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Scientific Reports*, 6(October 2015), p.20889. Available at: <http://www.nature.com/articles/srep20889>.
- Balleza, E., Kim, J.M. & Cluzel, P., 2018. Systematic characterization of maturation time of fluorescent proteins in living cells. *Nature Methods*, 15(1), pp.47–51.
- Berney, C. & Danuser, G., 2003. FRET or no FRET: a quantitative comparison. *Biophysical journal*, 84(6), pp.3992–4010. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349503751261> [Accessed February 15, 2016].
- Berney, C. & Danuser, G., 2003. FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophysical Journal*, 84(6), pp.3992–4010.
- Björnström, L. & Sjöberg, M., 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4), pp.833–842. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2004-0486>.
- Bolong, N. et al., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, 239(1–3), pp.229–246. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011916409000381> [Accessed July 18, 2014].
- Bornhorst, J.A. & Falke, J.J., 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*, 326, pp.245–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036646> [Accessed November 13, 2017].
- Brzozowski, a M. et al., 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652), pp.753–758.
- Calafat, A.M. et al., 2008. Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(1), pp.39–44. Available at: <http://www.jstor.org/stable/4641299>.
- Campbell, T.N. & Choy, F.Y.M., 2001. The effect of pH on Green Fluorescent Protein: a brief review. *Molecular Biology Today*, 2, pp.1–4.
- Carrotta, R. et al., 2001. Conformational characterization of oligomeric intermediates and aggregates in beta-lactoglobulin heat aggregation. *Protein Science*, 10(7), pp.1312–8.

Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420433><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2374118>.

- Casa, A.J. et al., 2015. The estrogen receptor alpha nuclear localization sequence is critical for fulvestrant-induced degradation of the receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, 415, pp.76–86. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720715300472> [Accessed March 27, 2016].
- Chang, H.S. et al., 2009. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *Journal of Hazardous Materials*, 172(1), pp.1–12. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389409010620> [Accessed April 22, 2016].
- Chi, E.Y. et al., 2003. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmaceutical Research*, 20(9), pp.1325–1336.
- Chudakov, D. et al., 2010. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. *Physiological Reviews*, 90(3), pp.1103–1163. Available at: <http://physrev.physiology.org/content/90/3/1103.short>.
- Clegg, R.M., 1996. Fluorescence resonance energy transfer. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*. pp. 179–252.
- D. A. Seielstad, K.E. Carlson, P. J. Kushner, G.L. Greene, J.A.K., 1995. Analysis of the structural core of the human estrogen receptor ligand binding domain by selective proteolysis/mass spectrometric analysis. *Biochemistry*, 34(39), pp.12605–12615. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7548010>.
- De, S., Girigoswami, A. & Das, S., 2005. Fluorescence probing of albumin–surfactant interaction. *Journal of Colloid and Interface Science*, 285(2), pp.562–573. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979704012251> [Accessed February 17, 2018].
- Dráb, T. et al., 2011. Native polyacrylamide electrophoresis in the presence of Ponceau Red to study oligomeric states of protein complexes. *Journal of Separation Science*, 34(14), pp.1692–1695. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201000869> [Accessed March 25, 2018].
- Dumbrepatil, A.B. et al., 2010. Development of a nanoparticle-based FRET sensor for ultrasensitive detection of phytoestrogen compounds. *The Analyst*, 135(11), pp.2879–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877819>.
- Eiler, S. et al., 2001. Overexpression, purification, and crystal structure of native ER alpha LBD. *Protein expression and purification*, 22(2), pp.165–173.
- Elobeid, M. & Allison, D., 2008. Putative Environmental-Endocrine Disruptors and Obesity: A Review. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity*, 15(5), pp.403–408.
- Evers, T.H. et al., 2006. Quantitative Understanding of the Energy Transfer between Fluorescent Proteins Connected via Flexible Peptide Linkers. *Biochemistry*, 45, pp.13183–13192. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi061288t> [Accessed November 4, 2017].
- Fechner, P. et al., 2009. An advanced biosensor for the prediction of estrogenic effects of endocrine-disrupting chemicals on the estrogen receptor alpha. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(6–7), pp.1579–1585.
- Fernandez, M.F. et al., 2007. Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: A nested case-control study. *Environmental Health Perspectives*, 115(SUPPL1).
- Ge Healthcare, 2012. *Recombinant protein purification: Principles and methods*, Uppsala,

- Sweden. Available at: Se modificó el número de unidades por μg de DNA y el tiempo de incubación sin lograr evitar la actividad estrella.
- Ge, J. et al., 2014. Occurrence, distribution and seasonal variations of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in surface waters of the East Lake, China. *Chemosphere*, 103, pp.256–262.
- Gore, A.C. et al., 2015. Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, (September), p.er.2015-1093. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/er.2015-1093>.
- Gray Jr., L.E. et al., 1999. (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation pr. *Toxicology and Industrial Health*, 15(1–2).
- Guo, Z. et al., 2013. Electrochemical Estrogen Receptor α based Biosensor for Label-Free Detection of Estradiol. *Electroanalysis*, 25(7), pp.1765–1772. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.201300163>.
- Gurer-Orhan, H. et al., 2005. A novel microplate reader-based high-throughput assay for estrogen receptor binding. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 85(3), pp.149–161.
- Habauzit, D. et al., 2008. Determination of estrogen presence in water by SPR using estrogen receptor dimerization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(3), pp.873–883.
- Hall, J.M., Couse, J.F. & Korach, K.S., 2001. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling*. *The Journal of biological chemistry*, 276(40), pp.36869–36872.
- Hall, J.M. & McDonnell, D.P., 1999. The estrogen receptor b-isoform (ERb) of the human estrogen receptor modulates ERa transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, 140(12), p.5566–78.
- Heindel, J.J., Newbold, R. & Schug, T.T., 2015. Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(11), pp.653–661. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2015.163> [Accessed November 17, 2016].
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V. & Angerer, J., 2007. Phthalates: toxicology and exposure. *International journal of hygiene and environmental health*, 210(5), pp.623–34. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463907001125> [Accessed September 27, 2015].
- Hill, J. & Phylip, H.L., 1997. Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Letters*, 409(3), pp.357–360. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579397005474> [Accessed November 19, 2017].
- Howdeshell, K.L. et al., 2007. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: Altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicological Sciences*, 99(1).
- Jiang, G. et al., 1995. Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Molecular and cellular biology*, 15(9), pp.5131–5143.
- Jurado, A. et al., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of The Total Environment*, 440, pp.82–94.
- Kenig, M. et al., 2006. Influence of the protein oligomericity on final yield after affinity tag

- removal in purification of recombinant proteins. *Journal of Chromatography A*, 1101(1–2), pp.293–306.
- Keski-Rahkonen, P. et al., 2015. Measurement of Estradiol in Human Serum by LC-MS/MS Using a Novel Estrogen-Specific Derivatization Reagent. *Analytical Chemistry*, 87(14), pp.7180–7186.
- Kimple, M.E., Brill, A.L. & Pasker, R.L., 2013. Overview of affinity tags for protein purification. *Current protocols in protein science*, 73, p.Unit 9.9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24510596> [Accessed November 9, 2017].
- Kuiper, G.G.J.M. et al., 1997. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology*, 138(3), pp.863–870. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/10.1210/endo.138.3.4979> [Accessed October 12, 2016].
- Kushner, P.J. et al., 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74(5), pp.311–317.
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*.
- Lapworth, D.J. et al., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, pp.287–303.
- Li, X. et al., 1997. Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence. *The Journal of biological chemistry*, 272(45), pp.28545–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353317> [Accessed November 13, 2017].
- Maurizi, M.R., 1992. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia*, 48(2), pp.178–201. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/BF01923511> [Accessed November 19, 2017].
- McDowal, J., 2004. Oestrogen Receptors. https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_4/Page_1.htm. Available at: https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_4/Page_1.htm [Accessed December 1, 2017].
- Mérot, Y. et al., 2004. The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. *The Journal of biological chemistry*, 279(25), pp.26184–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078875> [Accessed October 14, 2016].
- Métivier, R. et al., 2003. Estrogen Receptor- α Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. *Cell*, 115(6), pp.751–763.
- Nadal, A., Díaz, M. & Valverde, M.A., 2001. The Estrogen Trinity: Membrane, Cytosolic, and Nuclear Effects. *Physiology*, 16(6), pp.251–255. Available at: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physiologyonline.2001.16.6.251> [Accessed January 16, 2018].
- Nagai, T. et al., 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology*, 20(1), pp.87–90. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt0102-87>.
- New England Biolabs, 2018. Star Activity. Available at: <https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/star-activity>.
- Nghiem, L.D. et al., 2004. Estrogenic hormone removal from wastewater using NF/RO membranes. *Journal of Membrane Science*, 242(1–2), pp.37–45. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738804003333> [Accessed March 16, 2016].
- Nguyen, T.A. et al., 2012. Fluorescence polarization and fluctuation analysis monitors subunit proximity, stoichiometry, and protein complex hydrodynamics. *PloS one*, 7(5), p.e38209. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666486> [Accessed March 22, 2018].

- Oros, D. et al., 2005. Levels and Distribution of Polybrominated Diphenyl Ethers in Water, Surface Sediments, and Bivalves from the San Francisco Estuary. *Environmental Science & Technology*, (39), pp.22–41.
- Osborne, C.K. & Schiff, R., 2003. Growth factor receptor cross-talk with estrogen receptor as a mechanism for tamoxifen resistance in breast cancer. *The Breast*, 12(6), pp.362–367. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960977603001371> [Accessed October 17, 2016].
- Paech, K. et al., 1997. Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ER α and ER β at AP1 Sites. *Science*, 277(5331).
- Pédelacq, J.-D. et al., 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 24(1), pp.79–88.
- Pessela, B.C.C. et al., 2003. Overproduction of Thermus sp. strain T2 β -galactosidase in Escherichia coli and preparation by using tailor-made metal chelate supports. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), pp.1967–1972.
- Peters, J., 2014. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nature Publishing Group*, 15. Available at: <https://www.nature.com/articles/nrg3766.pdf> [Accessed January 10, 2018].
- Pingoud, A., Wilson, G.G. & Wende, W., 2014. Type II restriction endonucleases--a historical perspective and more. *Nucleic acids research*, 42(12), pp.7489–527. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878924> [Accessed November 10, 2017].
- Piston, D.W. & Kremers, G.-J., 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(9), pp.407–414. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000407001910>.
- Premier Biosoft, Primer Design Guide for PCR :: Learn Designing Primers for PCR. Available at: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html [Accessed January 20, 2018].
- Saeed, I.A. & Ashraf, S.S., 2009. Denaturation studies reveal significant differences between GFP and blue fluorescent protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(3), pp.236–241. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813009001202?via%3Dihub> [Accessed February 28, 2018].
- Seielstad, D.A. et al., 1995. Analysis of the Structural Core of the Human Estrogen Receptor Ligand Binding Domain by Selective Proteolysis/Mass Spectrometric Analysis. *Biochemistry*, 34(39), pp.12605–12615. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00039a016> [Accessed November 13, 2017].
- Seielstad, D.A. et al., 1995. Molecular characterization by mass spectrometry of the human estrogen receptor ligand-binding domain expressed in Escherichia coli. *Molecular Endocrinology*, 9(6), pp.647–658. Available at: <http://mend.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/me.9.6.647>.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A. & Tsien, R.Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods*, 2(12), pp.905–909.
- Shanle, E.K. & Xu, W., 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: identification and mechanisms of action. *Chemical research in toxicology*, 24(1), pp.6–19. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/tx100231n>.
- Shiau, A.K. et al., 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95(7), pp.927–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9875847> [Accessed November 27, 2016].
- Soares, A. et al., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 34(7), pp.1033–1049.

- Soto, A.M. & Sonnenschein, C., 2010. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(7), pp.363–370. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrendo.2010.87> [Accessed November 17, 2016].
- Swedenborg, E. et al., 2009. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal of molecular endocrinology*, 43(1), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211731> [Accessed November 24, 2016].
- Tamrazi, A. et al., 2002. Estrogen Receptor Dimerization: Ligand Binding Regulates Dimer Affinity and Dimer Dissociation Rate. *Molecular Endocrinology*, 16(12), pp.2706–2719. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2002-0250>.
- Tanenbaum, D.M. et al., 1998. Crystallographic Comparison of the Estrogen and Progesterone Receptor's Ligand Binding Domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), pp.5998–6003. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Tao, Y.J. & Zheng, W., 2011. Chaperones and the maturation of steroid hormone receptor complexes. *Oncotarget*, 2(3), pp.104–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21399235> [Accessed March 22, 2018].
- Tsien, R.Y., 1998. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Annual Review of Biochemistry*, 67(1), pp.509–544. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.67.1.509> [Accessed November 14, 2017].
- Usami, M., Mitsunaga, K. & Ohno, Y., 2002. Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 81(1), pp.47–55. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12127041.
- Vagenende, V., Yap, M.G.S. & Trout, B.L., 2009. Mechanisms of Protein Stabilization and Prevention of Protein Aggregation by Glycerol. *pubs.acs.org/Biochemistry Biochemistry*, 48, pp.11084–11096. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi900649t> [Accessed November 26, 2017].
- Wang, X.F. & Herman, B., 1996. *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy*, Wiley. Available at: <https://books.google.com.mx/books?id=GhCeMQEACAAJ>.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K. & Gustafsson, J.-A., 2008. Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nuclear receptor signaling*, 6, p.e003. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3084302&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.