

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

MUTAGÉNESIS COMBINATORIA DE TRES AMINOÁCIDOS  
LOCALIZADOS CERCA DEL CROMÓFORO DE LA PROTEÍNA ROJA  
FLUORESCENTE mKATE

TESIS

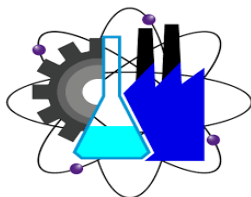
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
QUÍMICO INDUSTRIAL

PRESENTA

ABIGAIL ADRIANA ROLDAN SALGADO

ASESOR DE TESIS

DR. RUBÉN PAUL GAYTÁN COLIN



## **DEDICATORIA**

A mis padres

Por su apoyo constante para llegar al termino de un ciclo más de mi preparación y por su esfuerzo.

A mi hijo por ser la inspiración para terminar este proyecto.

A mis hermanos Álvaro y Juan que son parte esencial en mi vida.

A ti Eduardo que en donde quiera que estes, sé que me cuidas, siempre te tendré en mi mente y corazón, te amo hermano.

## **Agradecimientos**

A mi asesor el Dr. Rubén Paul Gaytan Colin por su guía, comprensión, enseñanzas y afecto que me brindo para hacer posible este proyecto.

A mis sinodales por hacer reconocer mis errores y brindarme su asesoría.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de síntesis química de ADN, con los cuales aprendí muchas cosas y pase gratos momentos Jorge Arturo Yáñez Ponce de León, Eugenio López busto, Santiago Becerra.

A el doctor Humberto Flores Soto por sus consejos y enseñanzas.

## INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. EVOLUCIÓN DE LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE .....	7
2.2. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS Y EVOLUCION DIRIGIDA .....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
4. HIPOTESIS.....	21
4.1. JUSTIFICACIÓN.....	22
5. OBJETIVOS .....	23
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	23
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	23
6. METODOS Y MATERIALES .....	24
6.1. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES.....	24
6.2 OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS.....	25
6.3. VECTOR DE CLONACIÓN .....	26
6.4. CEPA MICROBIANA.....	27
6.5. MEDIOS DE CULTIVO.....	28
6.6. ANTIBIÓTICO .....	28
6.7. CONSTRUCCIÓN DE LA GENOTECA.....	28
6.8. ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	30
6.9. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR A PARTIR DE GEL .....	30
6.10. CLONACIÓN .....	30
6.11. LIGACIÓN.....	31
6.12. TRANSFORMACIÓN.....	31
6.13. SELECCIÓN DE MUTANTES.....	32
6.14 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	32

6.15 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	33
6.16 ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	33
6.17. ESPECTROS DE ABSORBANCIA.....	34
6.18. ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN .....	35
6.19. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR Y DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO .....	35
ANEXOS .....	36
7. RESULTADOS Y DISCUSION .....	39
8. CONCLUSIONES .....	51
9. BIBLIOGRAFIA .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

μl	microlitros
μm	micromolar
Ac <sub>2</sub> O	Anhidrido acetico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala (A)	Alanina
AQ143	Proteína roja fluorescente obtenida de Actinia equina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Aspártico
avGFP	Aequorea victoria Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente de Aequorea victoria)
BFP	Blue Fluorescent Protein (proteína azul fluorescente)
bp	Pares de bases
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
CFP	Cian Fluorescent Protein (proteína cian fluorescente)
Cys (C)	Cisteína
dA	desoxiadenosina
dC	desoxicitidina
dG	desoxiguanosina
dNTPs	Desoxinucleotidos Trifosfato
DsRed	Discosoma striata Red (proteína roja de Discosoma striata)
dT	desoxitimidina
EqFP578	Proteína fluorescente con emisión máxima a 578 nm, obtenida de Entacma quadripolar
ETT	5-ethylthio-1H Tetrazol

FPS	Fluorescent Proteins (proteínas fluorescentes)
FRET	Forster Resonance Energy Transfer (transferencia de energía resonante Forster)
GFP	Green Fluorescent Protein (proteína verde fluorescente)
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Glutámico
Gly (G)	Glicina
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
HcRed	Proteína roja fluorescente de <i>Heteractis crispata</i>
His (H)	Histidina
I <sub>2</sub>	yodo
Ile (I)	Isoleucina
Km	Kanamicina
LB	Lauria Bertani
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mM	micromolar
mRFP1	Monomeric Red Fluorescent protein (Proteína roja fluorescente monomérica)
Nde I	<i>Neisseria denitrificans</i>
ng	nanogramos
nm	nanómetro
NMI	N-metilimidazol
PBS	Phosphate Buffered Saline(Buffer Salino de Fosfatos)
PCR	Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

pH	Potencial de Hidrogeno
Phe (F)	Fenilalanina
Pro (P)	Prolina
RFP	Red fluorescent Protein (proteína roja fluorescente)
Ser (S)	Serina
SHM	Mutación hipermutación somática
SOB	Super Optimal Broth
TCA	Ácido tricloroacético
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina
Xho I	Xanthomonas campestris pv Holcicola
YFP	Yellow Fluorescent Protein (proteína amarilla fluorescente)



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Medusas marinas <i>Aequorea Victoria</i> . . . . .	3
<b>FIGURA 2.</b> Estructura terciaria de la proteína verde fluorescente (GFP).....	4
<b>FIGURA 3.</b> Estructura del cromóforo de GFP de <i>Aequorea Victoria</i> . . . . .	5
<b>FIGURA 4.</b> Mecanismo de maduración del cromóforo de GFP . . . . .	6
<b>FIGURA 5.</b> Estructura tridimensional del tetrámero DsRed que muestra su estado oligomérico. Los monómeros se muestran en diferentes colores.....	8
<b>FIGURA 6.</b> Mecanismo de vía ramificada para la formación del cromóforo rojo (RFP) [24] ....	9
<b>FIGURA 7.</b> Espectros de emisión y excitación de las proteínas DsRed ( ) y las mutantes K83R(-) y K83M(--)	10
<b>FIGURA 8.</b> Conversión de la proteína roja fluorescente tetramérica nativa DsRed, a una RFP monomérica propuesta por ingeniería de proteínas.....	11
<b>FIGURA 9.</b> mFruits derivadas de mRFP1 por evolución dirigida y por hipermutación somática (SHM).....	12
<b>FIGURA 10.</b> .....Genealogía de variantes derivadas de DsRed, con mutaciones críticas para el fenotipo de cada variante. . . . .	13
<b>FIGURA 11.</b> ....Espectros de absorción de los principales cromóforos intracelulares y la proteína roja fluorescente Katushka.....	15
<b>FIGURA 12.</b> .....(a) Espectros normalizados de absorción (línea continua), excitación (----) y emisión (····) de la proteína pura mKate2. (b) Estabilidad de fluorescencia a diferentes pHs de las proteínas mKate2 (línea continua) y mKate (línea discontinua). . . . .	17
<b>FIGURA 13.</b> ...Método de separación de resina para la síntesis de bibliotecas de oligonucleótidos degenerados a saturación. . . . .	19
<b>FIGURA 14.</b> Estrategia experimental . . . . .	24
<b>FIGURA 15.</b> Sintetizador de ADN implementado para el ensamble de oligonucleótidos degenerados por el método de separación de resina. . . . .	25
<b>FIGURA 16.</b> Mapa genético del vector de clonación pJOQ.....	27
<b>FIGURA 17.</b> Estrategia de PCR traslapada para la construcción de la genoteca. . . . .	29
<b>FIGURA 18.</b> . Espectros de excitación y emisión de las proteínas rojas fluorescentes mKate2 (A) y mCherry (B).....	39
<b>FIGURA 19.</b> Comparación entre las secuencias de mKate2, mCherry y mRFP1.....	40
<b>FIGURA 20.</b> Gel de agarosa al 1% mostrando los fragmentos de ADN . . . . .	41

<b>FIGURA 21.</b> Fenotipo de bacterias E. coli expresando los genes fluorescentes EGFP, mCherry, mKate2, mKate2-M160Q y el gen no fluorescente mKate2-M160* .....	42
<b>FIGURA 22.</b> Espectros de excitación y emisión de la mutante mKate2-M160Q. ....	42
<b>FIGURA 23.</b> Estructura cristalográfica de la proteína mKate2, mostrando los aminoácidos cercanos al cromóforo.....	43
<b>FIGURA 24.</b> Bacterias de E. coli expresando el banco de genes mutantes de mKate2 donde se reemplazaron al azar los codones que codifican a los aminoácidos serina 143, alanina 158 y metionina 160.....	44
<b>FIGURA 25.</b> Secuencia primaria de aminoácidos de diversas mutantes que mostraron fenotipos interesantes .....	47
<b>FIGURA 26.</b> Espectros de emisión de las variantes fluorescentes de mKate2, excitándolas a 460 nm.....	48
<b>FIGURA 27.</b> Análisis electroforético de las variantes fluorescentes de mKate2. ....	49
<b>FIGURA 28.</b> Proteínas purificadas por HPLC.....	53
<b>FIGURA 29.</b> Espectros de absorción, excitación y emisión de algunas variantes de mKate2...	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Aminoácidos mutados, rendimiento cuántico (QY) y coeficiente de extinción (EC) de diferentes mutantes. Las mutantes R10D6 y R23H6 corresponden a mRaspberry y mPlum respectivamente.....	14
<b>TABLA 2.</b> Características espectrales de proteínas fluorescentes rojas y rojo lejano. ....	16
<b>TABLA 3.</b> Propiedades ópticas de las mutantes 1RFP1 y 1RFP12 comparadas con la proteína parental mKate2. ....	67

## 1. RESUMEN

Las proteínas fluorescentes son herramientas moleculares muy útiles en biología celular. Se utilizan como marcadores para estudiar procesos de expresión génica, localización subcelular de proteínas de interés, interacciones proteína-proteína, o bien para sensar condiciones intracelulares de pH o concentración de algún mensajero importante como el ión  $\text{Ca}^{2+}$  o GMPc (guanosin-monofosfato cíclico).

Todas las proteínas fluorescentes fueron aisladas de organismos marinos como medusas, corales, copépodos, lancetas, etc. y fueron posteriormente modificadas por técnicas de ingeniería de proteínas para adecuarlas a condiciones normales de funcionamiento de laboratorio.

Sin embargo, algunas de estas proteínas como la denominada proteína roja fluorescente (RFP) mKate, además del pico de emisión rojo principal centrado en 615 nm, también presenta un pico de emisión verde a 504 nm, generado por un cromóforo tipo proteína verde fluorescente (GFP) que no logra madurar completamente hasta el cromóforo tipo RFP. Este contaminante de la proteína mKate representa una limitante para su uso, sobre todo cuando se requiere monitorear dos eventos a la vez en una célula, donde uno de ellos es rastreado por marcaje con la proteína verde fluorescente original cuya emisión está centrada entre 504-508 nm.

Para tratar de eliminar este pico de emisión indeseable en mKate, en un primer experimento realizado en nuestro laboratorio se construyó la mutante sitio-dirigida mKate-M160Q, en analogía a lo que se hizo con la proteína mRFP1.4 precursora de la proteína roja fluorescente mCherry, la cual ya no presenta el pico de emisión verde. Se probó esta opción porque mCherry y mKate presentan una homología de 53% a nivel de secuencia de aminoácidos, y tanto mKate como mRFP1.4 contienen el aminoácido metionina en la posición 160. La mutación M160Q en mKate redujo el pico de emisión verde comparado con la proteína original, pero no lo desapareció.

Al analizar la estructura cristalográfica de la proteína mKate, se observó que el aminoácido metionina 160 (Met160) se localizaba muy cerca del cromóforo, al igual que los aminoácidos serina 143 (Ser143) y alanina 158 (Ala158), lo cual los convertía en buenos candidatos para ser reemplazados por otros aminoácidos, a fin de encontrar alguna o algunas sustituciones que logran desaparecer el pico de emisión verde.

Debido a que en el laboratorio contamos con la tecnología para realizar sustituciones de cualquier aminoácido silvestre por un conjunto de los 20 aminoácidos comunes, se decidió aplicar esta aproximación para sustituir los tres aminoácidos al mismo tiempo a fin de generar una biblioteca combinatoria de variantes de los tres aminoácidos, la cual debía contener una población de 8,000 proteínas mutantes.

Tras ensamblar dicha biblioteca por la técnica de PCR traslapada y analizar diversas mutantes funcionales por espectroscopía de fluorescencia, se encontró una mutante denominada 1RFP12, la cual presentó un pico de emisión verde muy disminuido y un pico principal de emisión roja centrado en 570 nm. Esta mutante presentó las mutaciones serina 143 por asparagina (S143N), alanina 158 por serina (A158S) y metionina 160 por glutamina (M160Q).

1RFP12 se aisló, purificó y caracterizó bioquímicamente, y ahora puede usarse como una proteína reportera estrictamente roja. Además, se encontraron otras proteínas con fenotipos interesantes, las cuales presentan coloraciones anaranjadas, guindas y verdes, de las cuales algunas son fluorescentes, y otras son sólo cromoproteínas no fluorescentes.

También se encontraron dos proteínas clasificadas como “Large Stoke Shift”, caracterizadas por presentar picos máximos de excitación y emisión con diferencia aproximada de 100 nm, las cuales fueron denominadas 3RFP5 y 3RFP7. La mutante 3RFP5 presenta las mutaciones serina 143 por histidina (S143H), alanina 158 por cisteína (A158C), metionina 160 por histidina (M160H), mientras que la mutante 3RFP7 presenta las mutaciones alanina 158 por valina (A158V) y metionina 160 por lisina (M160K). De esta manera, estas proteínas se excitan en la región azul (470 nm) del espectro visible y emiten en la región roja, aproximadamente a 580 nm. Estas proteínas pueden usarse en combinación con GFP para analizar dos eventos intracelulares distintos, excitando con una sola longitud de onda ambos marcadores.

## 2. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la proteína verde fluorescente o GFP por sus siglas en inglés (Green Fluorescent Protein), aislada de la medusa bioluminiscente *Aequorea Victoria* se ha convertido en la proteína más estudiada en bioquímica y biología celular, debido a su propiedad de emitir luz verde cuando se excita con luz azul.[1] Además, ha sido modificada genéticamente para emitir muchos colores en diversas longitudes de onda. Por esta propiedad, la GFP es el marcador de excelencia en estudios de expresión genética y localización de proteínas en varios sistemas biológicos.[2]

La GFP fue descubierta a principio de la década de 1960 por Osamu Shimomura en la Universidad de Princeton, al tratar de elucidar el fenómeno que causaba la bioluminescencia en la medusa marina *Aequorea victoria*. Para esta labor recortó el borde de la cúpula de miles de medusas (**Figura 1**) que contenían los órganos de luz, exprimió las tiras de estos tejidos y notó que el jugo extraído seguía brillando por espacio de varias horas.[3]



**FIGURA 1.** Medusas marinas *Aequorea Victoria*. Cada medusa posee unos 100 puntos bioluminiscentes del tamaño de una cabeza de alfiler en los bordes externos de la cúpula. Una fotoproteína llamada aequorina emite luz azul al contacto con iones calcio y excita a la GFP contenida en los mismos órganos, produciendo luz verde.

Este mismo jugo presentaba un aspecto ligeramente verdoso a la luz del sol y una intensa fluorescencia del mismo color al iluminarse con luz ultravioleta o activarse con iones calcio. Sin embargo, cuando Osamu Shimomura y Frank H. Johnson lograron aislar la fotoproteína activada por calcio, descubrieron que la proteína pura producía luz azul al activarse con iones calcio, pero no producía la luz verde observada en los fotoórganos o en el jugo crudo, la llamaron aequorina.

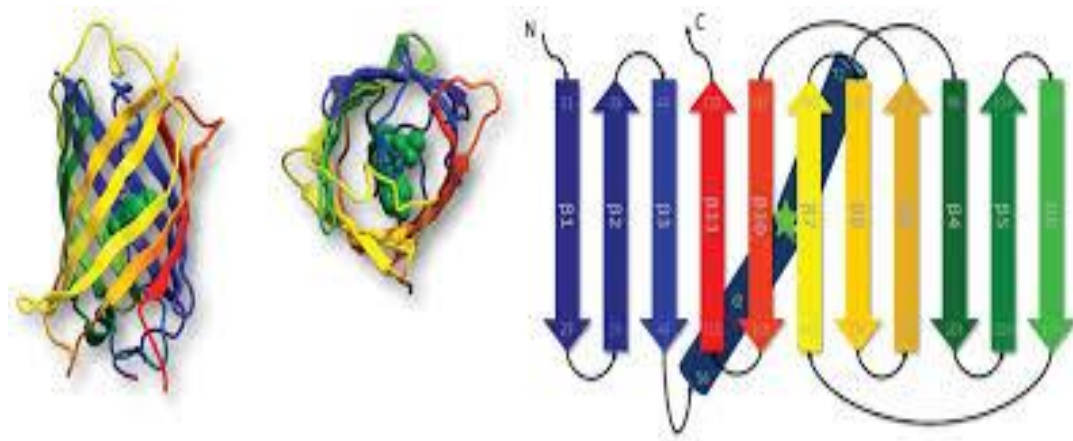
En cambio, una de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación si presentaba un tono ligeramente verde, pero no se activaba con iones calcio. Al paso de los años lograron aislar esta segunda proteína y demostraron que el fenómeno de bioluminescencia observado en las medusas se debe a un mecanismo de transferencia de energía denominado FRET (Förster Resonance Energy Transfer), donde la luz azul producida por la aequorina es absorbida por la GFP y reemitida en forma de luz verde. La GFP pura también era capaz de absorber luz ultravioleta de longitud de onda larga y reemitirla como luz verde, igual que ocurría con el jugo crudo. El fenómeno de absorción de luz de un color y reemisión de otro se denomina fluorescencia.

Se determinó que la proteína GFP presentaba un sólo pico máximo de emisión en el espectro visible a 508 nm, cercano al que emite el tejido vivo de la medusa, mientras que la aequorina pura lo tenía a 470 nm en la zona azul del espectro visible, coincidiendo con uno de los dos

picos máximos de absorción de la GFP, centrados en 395 nm y 474 nm, indicando por tanto que la interacción FRET entre las dos proteínas era posible.[1]

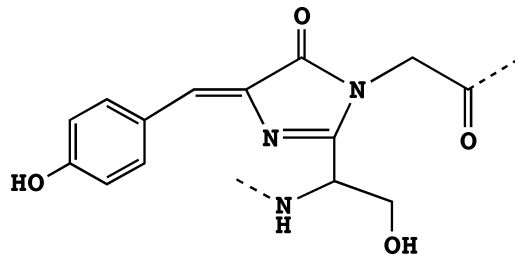
En 1969, Morin y Hastings encontraron el mismo fenómeno bioluminiscente en los celentéreos *obelia* y *renilla*, confirmando el mecanismo de transferencia de energía sin radiación. De hecho, ellos fueron los que acuñaron el término proteína verde fluorescente (GFP) para las proteínas verdes aisladas de los tres organismos marinos.[4, 5]

La GFP es una proteína monomérica relativamente pequeña, compuesta por 238 aminoácidos y presenta un peso molecular promedio de 27 KDa. Su estructura terciaria mostrada en la **Figura 2**, se denomina  $\beta$ -barril debido a que asemeja un barril cuyas paredes están formadas por 11 cadenas beta que en su interior contienen una alfa hélice, donde tres de sus aminoácidos forman espontáneamente el cromóforo en una reacción post-traduccional.[6] Este cromóforo es el causante de que se produzca la fluorescencia verde al irradiar la proteína con luz azul o ultravioleta. Los aminoácidos originales que dieron lugar al cromóforo son serina 65 (Ser65), tirosina 66 (Tyr66) y glicina 67 (Gly67). La estructura de barril es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la fluorescencia, en primera razón porque permite que se lleve a cabo la formación del cromóforo y en segunda porque una vez formado el cromóforo lo aísla del medio ambiente acuoso que rodea a la proteína y que podría desactivar al cromóforo cuando se encuentra en estado excitado.[1]



**FIGURA 2.** Estructura terciaria de la proteína verde fluorescente (GFP)

La estructura química del cromóforo de GFP se muestra en la **Figura 3**; su nombre técnico es 4-(p-hydroxybenzylidene)-5-imidazolinone. El radical R2 representa la parte carboxilo del resto de la proteína a partir del aminoácido 68, mientras que el radical R1 representa la parte amino desde el aminoácido 1 hasta el aminoácido 64 (Shimomura 1979)[7]. De esta manera, una vez formado el cromóforo permanece covalentemente unido al resto de la proteína y se localiza en medio del barril.



**FIGURA 3.** Estructura del cromóforo de GFP de *Aequorea Victoria*.

Hasta 1994, todos los estudios realizados sobre la GFP fueron hechos con proteína natural aislada de los diversos organismos marinos. Sin embargo, tras cinco años de investigación, fue en 1992 cuando el biólogo molecular norteamericano Douglas Prasher logró aislar y clonar el gen *gfp* en *Escherichia coli*, determinando al mismo tiempo de manera indirecta la secuencia exacta de los 238 aminoácidos que componen a la proteína.[8] Prasher estableció el fundamento para el uso actual de la GFP como marcador de expresión y localización celular, pero lamentablemente no clonó el gen en la fase de lectura apropiada y por tanto las bacterias que lo contenían eran incapaces de producir la proteína GFP correcta y de brillar como ocurría en los órganos de la medusa. Por tanto, Prasher concluyó erróneamente que probablemente eran necesarias otras proteínas o cofactores para hacer fluorescer a la proteína, mismos que debían estar presentes en *A. Victoria* pero no en *E. coli* (Zimmer, 2009)[3]

En 1992 el estadounidense Martin Chalfie tuvo conocimiento de la existencia de la GFP y comprendió que su capacidad para fluorescer en forma autónoma podría convertirla en un marcador celular ideal para el estudio de los organismos que él investigaba. Usando técnicas de biología molecular y la recién descubierta e implementada técnica de PCR (siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction), logró clonar apropiadamente el gen de la GFP en un vector de expresión, utilizándolo para transformar tanto a la bacteria gram-negativa *E. coli* como al gusano nemátodo transparente *Caenorhabditis elegans*. [8] Tras su crecimiento, ambos organismos resultaron fluorescentes y de esta forma se demostró que la GFP era funcional tanto en organismos procariontes como eucariontes, sin necesidad de agregar componentes adicionales. Este fue el primer paso en la revolución de la GFP y otorgó el premio Nobel 2008 a Martin Chalfie, Osamu Shimomura y Roger Tsien.[3]

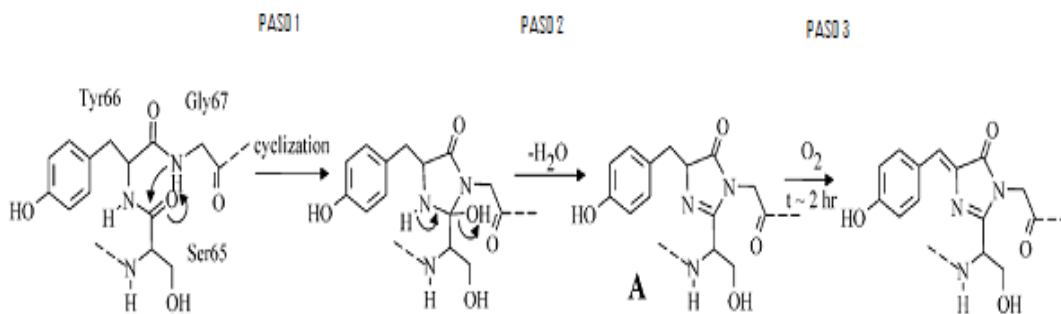
A partir de este momento, todos los experimentos para lograr una mejor caracterización de la GFP, así como para su uso como marcador genético se realizaron con GFP recombinante, es decir, GFP clonada y expresada en organismos diferentes a *A. victoria*. [9]

Roger Tsien, además de producir las primeras mutantes artificiales de GFP, [10] propuso el mecanismo de maduración del cromóforo de la GFP formado por los aminoácidos contiguos



65-67, considerando que sólo cuatro residuos de toda la proteína se conservan estrictamente entre todas las GFPs naturales, independientemente de su color final. Estos aminoácidos son Tyr66, Gly67, Arg96, y Glu222.[1]

La formación del cromóforo verde en proteínas fluorescentes recién plegadas es robusta y no requiere cofactores o enzimas adicionales que ayuden en el proceso. A excepción de Gly67, Arg96 y Glu222, el proceso de formación del cromóforo mejor conocido como proceso de maduración, puede tolerar numerosas mutaciones localizadas dentro y alrededor del cromóforo.[11] El proceso es impulsado por la química altamente estereoespecífica forzada por la estructura de la proteína. El proceso de maduración, mostrado en la Figura 4, se lleva a cabo en tres pasos principales (ciclización, deshidratación y oxidación), similares a los involucrados en la ciclización del tripéptido de la enzima histidin-amoniaco liasa y enzimas relacionadas.[12]



**FIGURA 4.** Mecanismo de maduración del cromóforo de GFP

#### Mecanismo de maduración propuesto:

1. En el primer paso, la ciclización intracatenaria es favorecida por la curvatura impuesta por la estructura  $\beta$ -barril sobre el centro de la  $\alpha$ -hélice que contiene el tripéptido activo.[13, 14] La conformación local de la proteína acerca el nitrógeno de Gly67 en la orientación apropiada al grupo carbonilo de Ser65 y prepara el ataque nucleofílico inicial que conduce a la formación de un anillo de imidazolona. Esta primera etapa de ciclización es catalizada por la carga positiva de la cadena lateral de Arg96, la cual hace más nucleofílico el nitrógeno de Gly67.
2. En el segundo paso, el proceso de deshidratación convierte el anillo de imidazolona a imidazolinona y parece ser sensible a la naturaleza aromática del residuo 66. Este paso se cree que conduce a la formación de un intermediario enolato, que puede ser atrapado por reducción química anaeróbica inversa del cromóforo maduro utilizando ditionito y otros agentes reductores.

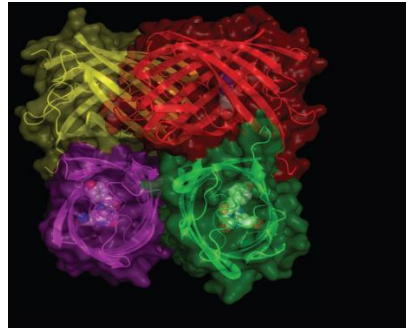
3. En el tercer paso, la oxidación del enlace entre los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  de Tyr66 con oxígeno ambiental, completa el sistema conjugado entre el anillo de fenol de la tirosina y el anillo de imidazolinona recién formado, produciendo la fluorescencia del cromóforo. Durante este paso, se cree que el carboxilato de Glu222 funciona como una base general, facilitando la abstracción de protones desde el C $\alpha$  de Tyr66. La velocidad de maduración del cromóforo y la acumulación de fluorescencia es lenta (20-120 min), estando limitada por la velocidad de la etapa de oxidación, que se acompaña de la producción estequiométrica de peróxido de hidrógeno.[15, 16]

Estas investigaciones fueron importantes para el avance en la evolución artificial de las proteínas fluorescentes (FPs). La proteína silvestre (avGFP) se modificó rápidamente para producir variantes que emiten luz azul (BFP), cian (CFP) y amarilla (YFP) (Tsien et al., 1998)[1, 17], e incluso algunas variantes verdes mucho más fluorescentes como las denominadas EGFP[18] y superfolder.[19]

Sin embargo, las regiones espectrales anaranjada y roja permanecieron inalcanzables a partir de avGFP, y solo fueron posibles cuando se clonó el gen de la primer proteína roja fluorescente (RFP) a partir de un arrecife de coral no-bioluminescente denominado *Discosoma striata*.[20] Este avance puso en marcha una segunda fase en la búsqueda y generación de más proteínas fluorescentes.

## 2.1. EVOLUCIÓN DE LA PROTEÍNA ROJA FLUORESCENTE

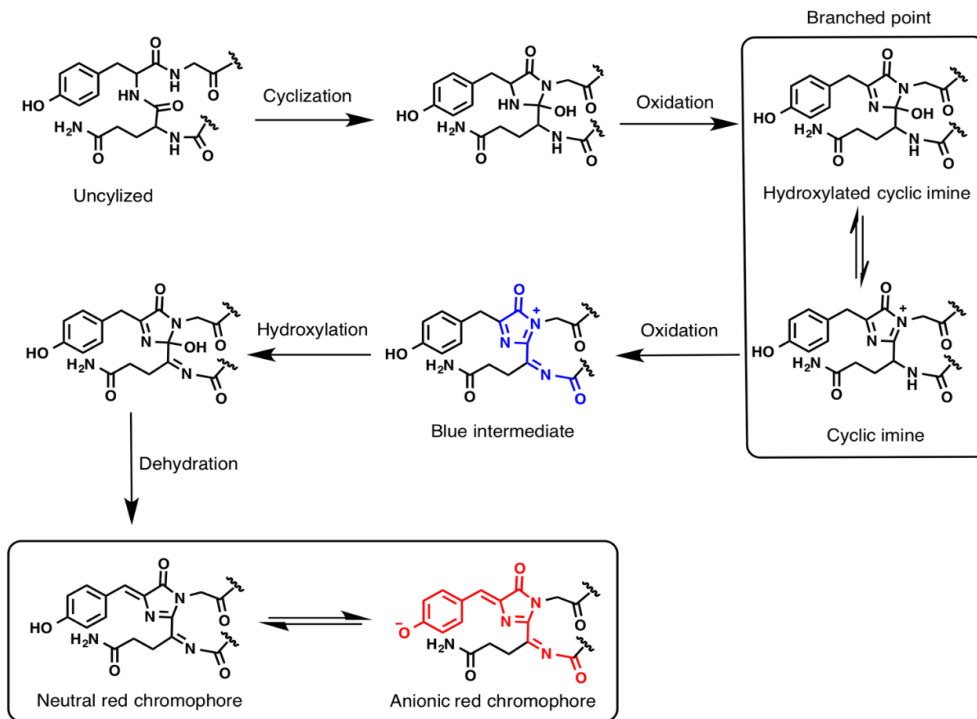
En 1999 Sergei Lukyanov y colaboradores reportaron la primer proteína roja fluorescente, después de haber clonado seis genes de proteínas homólogas a la GFP, todas con una identidad de 26-30% con respecto a ésta última.[21] Dos de ellas presentaron características espectrales diferentes a GFP, emitiendo luz amarilla y roja, es decir, luz de mayor longitud de onda que la emitida por GFP. Como se mencionó anteriormente, los genes de estas proteínas fueron aislados de arrecifes de corales muy coloridos, pero no bioluminescentes. A pesar de la baja identidad en la secuencia de aminoácidos, se predijo que las proteínas de coral formarían  $\beta$ -barriles compuestos por 11 cadenas  $\beta$ , similares a la GFP, porque los dos residuos cruciales que contribuyen a la formación del cromóforo de GFP, Tyr66 y Gly67, y algunos residuos polares importantes que están en contacto con el cromóforo como Arg96 y Glu222 estaban conservados.[22] Sin embargo, la proteína emisora de luz roja identificada como drFP583 o DsRed, resultó ser una proteína tetramérica, a diferencia de la GFP que es una proteína monomérica (**Figura 5**); es decir, la proteína madura tiende a asociarse en grupo de cuatro unidades. El estado oligomérico de esta proteína dificultaba su uso como etiqueta de fusión a otras proteínas de interés, porque los grandes complejos proteicos tienden a ser poco solubles y se agregan dentro de las células.



**FIGURA 5.** Estructura tridimensional del tetrámero DsRed que muestra su estado oligomérico. Los monómeros se muestran en diferentes colores.

Por tanto, aunque DsRed resultaba muy atractiva para ser usada en estudios de expresión génica y localización celular, porque presenta máximos de excitación / emisión a 558 y 583 nm respectivamente, y está compuesta por 225 aminoácidos, siendo de tamaño similar a GFP, [20] desafortunadamente no era apropiada para trabajos que requerían el manejo de imágenes porque es tetramérica, madura lentamente y posee una alta proporción del estado intermediario verde, necesario para llegar al estado rojo. De hecho, Roger Tsien demostró que el cromóforo DsRed se forma por una oxidación adicional N-acilimino del aminoácido 65, que extiende la conjugación del cromóforo de GFP hasta el grupo carbonilo del aminoácido 64.[3]

DsRed forma su cromóforo a partir de tres aminoácidos secuenciales: Gln65, Tyr66 y Gly67. [23] Uno de los mecanismos propuestos involucra una ruta ramificada que puede conducir principalmente al cromóforo rojo como se muestra en la **Figura 6**, pero también al cromóforo verde en menor proporción.[24]



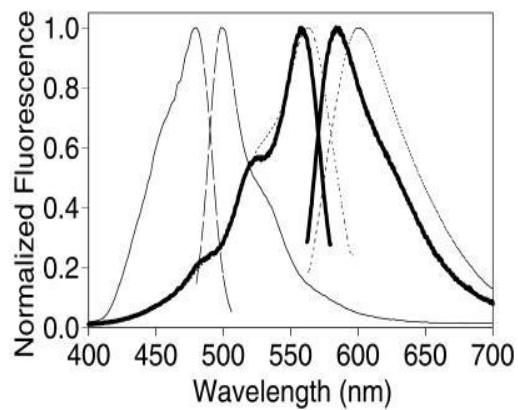
**FIGURA 6.** Mecanismo de vía ramificada para la formación del cromóforo rojo (RFP) [24]

### Mecanismo ramificado para la formación del cromóforo rojo

1. En este mecanismo ramificado, la formación del cromóforo comienza con la ciclización de la cadena principal para formar un anillo intermediario heterocíclico de cinco miembros.
2. Este anillo se somete a una etapa inicial de oxidación para formar una imina cíclica hidroxilada, que se equilibra con una imina cíclica. En este punto el mecanismo se ramifica, la deshidratación de la imina cíclica hidroxilada conduce a la formación del cromóforo fluorescente verde, mientras que la oxidación irreversible de la imina cíclica conduce a un intermedio con fluorescencia azul.
3. La deshidroxilación y deshidratación adicional conducen a la formación del cromóforo fluorescente de color rojo de DsRed.

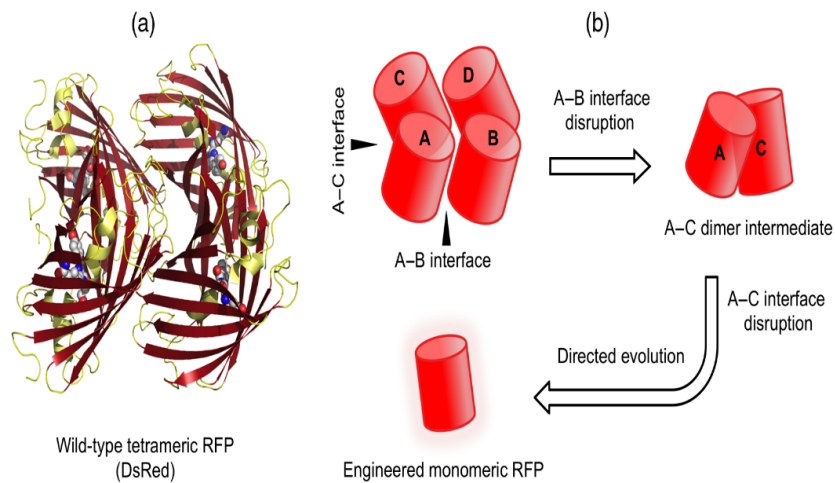
El mecanismo de formación del cromóforo RFP y la influencia de su medio ambiente local en sus propiedades espectrales, abrió nuevas vías para la ingeniería de proteínas fluorescentes, generando proteínas con nuevos colores y nuevas propiedades.

Así, por ejemplo, la mutación K83R en DsRed produjo una mutante que presenta un máximo de emisión de 602 nm (**Figura 7**), con relativamente poca fluorescencia verde, aunque desafortunadamente su maduración es más lenta que la proteína silvestre DsRed.[25] En cambio, la mutación K83M detuvo el proceso de maduración en el estado intermedio verde.



**FIGURA 7.** Espectros de emisión y excitación de las proteínas DsRed (—) y las mutantes K83R(-) y K83M(--)

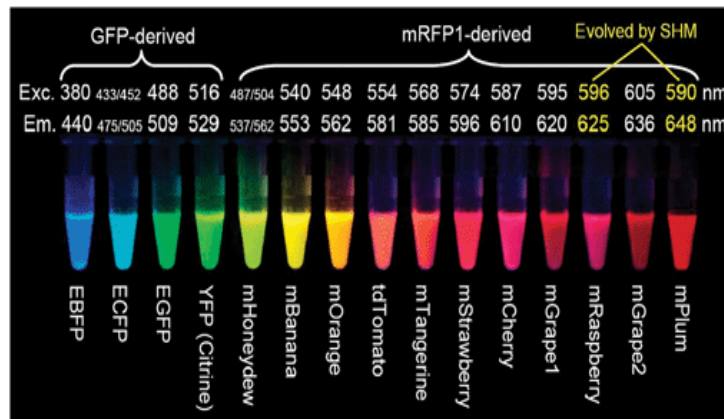
La evolución gradual de DsRed a un dímero y posteriormente a un monómero dió como resultado la proteína mRFP1 (Proteína Roja Fluorescente monomérica). Para esta construcción, cada interface entre las diferentes subunidades se vio interrumpida por la inserción de argininas, que inicialmente destruyeron la fluorescencia de las mutantes intermedias (**Figura 8**). Tras recuperarle la fluorescencia por evolución dirigida,[26, 27] mRFP1 contenía un total de 33 mutaciones con respecto a la DsRed nativa. [28]



**FIGURA 8.** Conversión de la proteína roja fluorescente tetramérica nativa DsRed, a una RFP monomérica propuesta por ingeniería de proteínas. (a) Representación de la estructura nativa tetramérica de DsRed. (b) La interrupción de la primera interface A-B, produce un dímero A-C intermedio y posteriormente de la interface A-C produce una RFP monomérica. Las mutaciones en la interface son típicamente perjudiciales para el plegamiento correcto y maduración del cromóforo, ya sea en el dímero intermedio o en el monómero final; por lo tanto, estas variantes deben ser rescatadas por evolución dirigida.

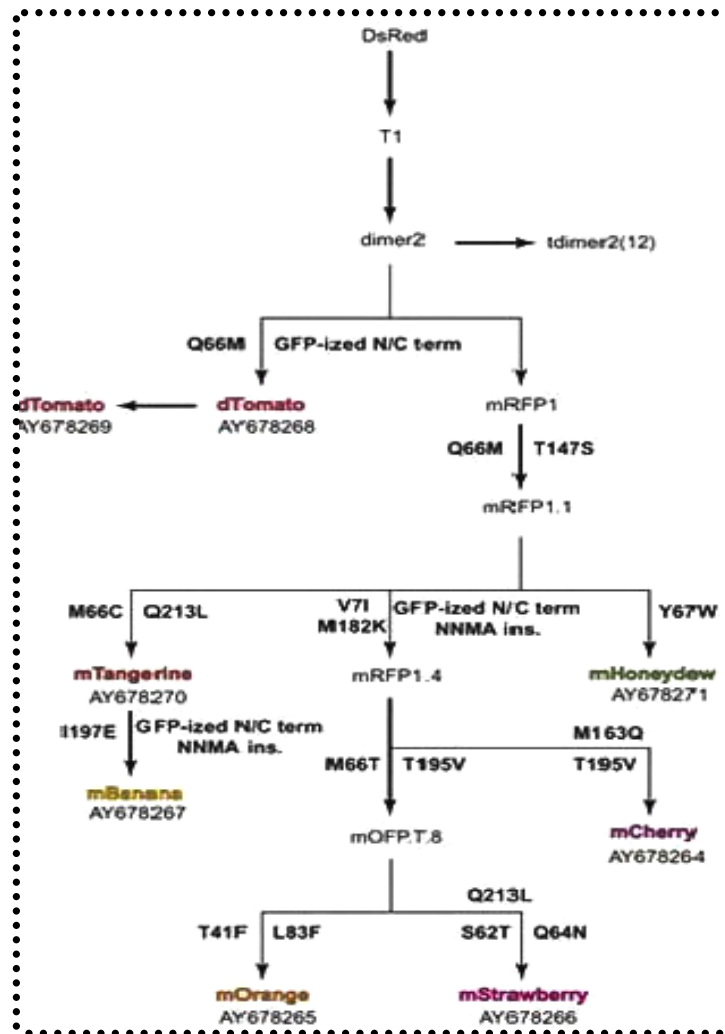
La proteína monomérica mRFP1 superó los tres problemas críticos relacionados con la naturaleza tetramérica de DsRed. Específicamente, mRFP1 es un monómero que madura rápidamente y tiene una emisión mínima cuando se excita a longitudes de onda óptimas para GFP. Esta característica convirtió a mRFP1 en la proteína fluorescente roja más adecuada para la construcción de proteínas de fusión, sin embargo, no era ideal para todas las aplicaciones porque su rendimiento cuántico y coeficiente de extinción molar son bajos. [28]

El intento de mejorar el brillo de mRFP1 por sustitución combinatoria de aminoácidos cercanos al cromóforo y evolución dirigida, produjo una serie de variantes de RFP muy útiles en Biología Celular, conocidas como mFruits (**Figura 9**),[29-31]



**FIGURA 9.** mFruits derivadas de mRFP1 por evolucion dirigida y por hipermutación somática (SHM)

Las proteínas notables en esta serie son mApple, mCherry y mPlum, que exhiben máximos de emisión a 592 nm, 610 nm y 649 nm respectivamente. En la **Figura 10** se muestran las mutaciones críticas para el fenotipo de cada variante de las mFruits. mApple es una de las proteínas rojas más brillantes, mCherry es solo la mitad de brillante pero es espectralmente estable. Ambas proteínas son relativamente brillantes y aunque mApple presenta mayor brillo que mCherry, muestra una fotoestabilidad compleja,[32] así que mCherry es la más utilizada porque funciona bien en fusiones y es buena opción para el etiquetado multicolor en combinación con BFPs, CFPs, GFPs, YFPs, o FPs anaranjadas.



**FIGURA 10.** Genealogía de variantes derivadas de DsRed, con mutaciones críticas para el fenotipo de cada variante.

En la búsqueda constante de proteínas fluorescentes con propiedades espectrales distintas a DsRed, se aislaron más RFPs de otras especies de anthozoa, específicamente de las anemonas de mar *Heteractis crispa*, *Condylactis gigantea*, *Goniopora tenuidens* y *Entacmaea quadricolor*. Así, por ejemplo, la mutagénesis dirigida y aleatoria de la cromoproteína *H. Crispa* dio como resultado la proteína denominada HcRed (*Heteractis Crispa* FP), la cual contiene seis sustituciones con respecto a la proteína parental y exhibe máximos de excitación y emisión a 592 nm y 645 nm, respectivamente. La comparación directa con DsRed reveló



una diferencia clara entre el color anaranjado y el color rojo verdadero de HcRed, sin embargo, todas las mutantes fluorescentes eran tetraméricas.[33, 34]

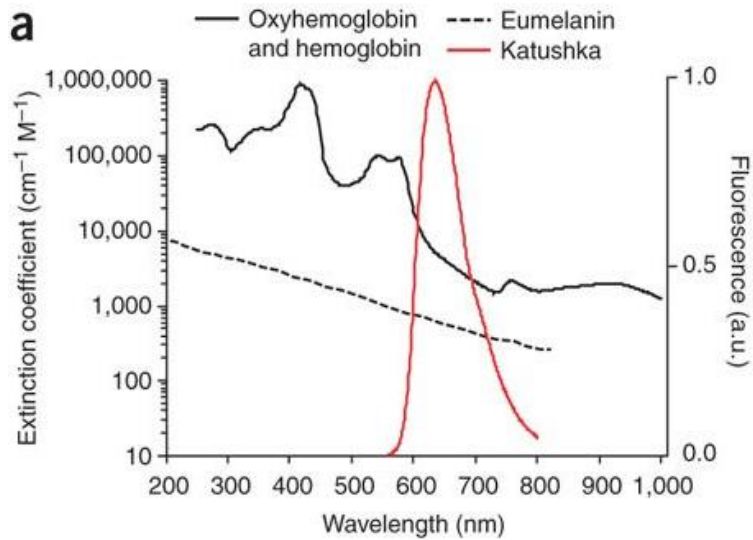
Otras variantes de la proteína nativa eqFP578 de la anemona de mar *E. quadricolor*, fueron la proteína monomérica brillante TagRFP que tiene máximos de excitación y emisión a 555 nm y 584 nm, y la proteína variante FusionRed con máximos de excitación y emisión a 580 nm y 608 nm, mientras que en ese mismo linaje la variante mRuby ( $\lambda_{ex}$  558 nm y  $\lambda_{em}$  605 nm) resultó ser una de las proteínas rojas monoméricas más fluorescentes, aunque en algunos casos formó dímeros u oligómeros de orden superior, que condujeron a la agregación y citotoxicidad cuando se fusionó con otras proteínas.[35, 36]

En 2004 Wang et al produjeron por hipermutación somática (SHM) la primera proteína verdaderamente fluorescente en el rojo lejano. Esta proteína denominada "mPlum" era la única opción monomérica en el rojo lejano, en la región espectral de 650 nm. Desafortunadamente, era solo 10% brillante con respecto a EGFP. Otra mutante encontrada fue "mRaspberry" cuyo máximo de emisión fue de 625 nm (Tabla 1).[37, 38]

**TABLA 1.** Aminoácidos reemplazados, rendimiento cuántico (QY) y coeficiente de extinción (EC) de diferentes mutantes. Las mutantes R10D6 y R23H6 corresponden a mRaspberry y mPlum respectivamente.[38]

	QY	EC	16	17	45	65	71	124	127	161	166	191
<b>mRFP</b>	<b>0.26</b>	<b>80</b>	<b>V</b>	<b>R</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>G</b>
<b>R10F5</b>	<b>0.13</b>	<b>88</b>				<b>C</b>		<b>V</b>		<b>M</b>		
<b>R10F6</b>	<b>0.14</b>	<b>89</b>				<b>C</b>				<b>M</b>		
<b>R10D6</b>	<b>0.15</b>	<b>86</b>				<b>C</b>	<b>G</b>			<b>M</b>		
<b>R14H4</b>	<b>0.10</b>	<b>40</b>	<b>E</b>			<b>I</b>				<b>M</b>		
<b>R14G7</b>	<b>0.11</b>	<b>42</b>	<b>E</b>			<b>I</b>				<b>M</b>		<b>D</b>
<b>R14C12</b>	<b>0.11</b>	<b>40</b>	<b>E</b>			<b>I</b>			<b>S</b>	<b>M</b>		
<b>R21E1</b>	<b>0.10</b>	<b>32</b>	<b>E</b>			<b>I</b>		<b>V</b>		<b>M</b>		
<b>R21E3</b>	<b>0.10</b>	<b>34</b>	<b>E</b>			<b>I</b>		<b>V</b>	<b>S</b>	<b>M</b>		
<b>R21F1</b>	<b>0.10</b>	<b>33</b>	<b>E</b>			<b>I</b>		<b>V</b>		<b>M</b>	<b>R</b>	
<b>R23F2</b>	<b>0.10</b>	<b>37</b>	<b>E</b>	<b>H</b>		<b>I</b>		<b>V</b>		<b>M</b>		
<b>R23H6</b>	<b>0.10</b>	<b>41</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>R</b>	<b>I</b>		<b>V</b>		<b>M</b>	<b>R</b>	

Recientemente se han desarrollado otras proteínas fluorescentes en el rojo lejano cuyos máximos de emisión alcanzan la barrera de los 650 nm, como HcRed14, mPlum15 y AQ143.[39] Sin embargo, este tipo de proteínas se caracterizan también por una brillantez pobre. Además, la excitación máxima de la mayoría de las proteínas fluorescentes en el rojo lejano se encuentra alrededor de 550-560 nm, longitud de onda a la que los tejidos vivos son casi opacos (**Figura 11**) y por ello estas proteínas no pueden ser eficazmente excitadas. Por lo tanto, había una necesidad urgente en desarrollar proteínas fluorescentes en el rojo lejano, que presentaran una reducción mínima de pérdida de luz y permitieran al mismo tiempo aumentar la sensibilidad de las técnicas de imagen de todo el cuerpo.[40]



**FIGURA 11.** Espectros de absorción de los principales cromóforos intracelulares y la proteína roja fluorescente Katushka.

Por estas razones, Shcherbo et al. desarrollaron las proteínas fluorescentes rojas Katushka y mKate a partir de la evolución dirigida de la proteína roja original tetramérica eqFP578.[40] Katushka resultó ser una proteína dimérica, diez veces más brillante que las espectralmente cercanas HcRed o mPlum, y también se caracterizó por presentar una maduración rápida, mayor estabilidad a pH y mayor fotoestabilidad. Estas características demostraron la superioridad de Katushka en la visualización de imágenes de cuerpos completos, en comparación directa con las otras proteínas fluorescentes de rojo lejano. A partir de Katushka se desarrolló la proteína monomérica mKate, la cual se caracterizó por su alta brillantez y fotoestabilidad, resultando ser un excelente marcador fluorescente para el etiquetado de proteínas intracelulares no fluorescentes. Las características espectrales de estas dos proteínas se resumen en la **Tabla 2**, junto a otras RFPs.

**TABLA 2 .** Características espectrales de proteínas fluorescentes rojas y rojo lejano.

Protein	Excitation Maximum	Emission Maximum	QY	EC (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) (at excitation maximum)	Relative brightness <sup>a</sup>	Brightness beyond 650 nm <sup>b</sup>	References
TurboRFP	553	574	0.67	92,000	1.87	42	17
TagRFP	555	584	0.48	100,000	1.46	34	17
DsRed2	563	588	0.55	43,800 <sup>e</sup>	65,000.73 <sup>e</sup>	38	26,27
DsRed-Express	555	588	0.51	38,000	39,500.59	23	28
eqFP611	559	611	0.45	78,000	1.06	57	29
mCherry	587	615	0.22	72,000 <sup>c</sup>	78,000.48 <sup>c</sup>	42	24
mRaspberry	598	625	0.15	86,000 <sup>e</sup>	79,000.39 <sup>e</sup>	44	15
Katushka	588	635	0.34	65,000	0.67	100	
mKate	588	635	0.33	45,000	0.45	67	
mPlum	590	649	0.10	41,000 <sup>e</sup>	22,000.12 <sup>e</sup>	13	15
HcRed	594	649	0.05	70,000	0.10	20	14
AQ143	595	655	0.04	90,000	0.11	23	16

Tras analizar la estructura cristalina de mkate en distintas condiciones de pH, se llegó a la conclusión que su cromóforo es capaz de adoptar las conformaciones *cis* y *trans*. La conformación *cis* es fluorescente brillante y aumenta proporcionalmente con el pH, mientras la conformación *trans* es más tenue y disminuye con el aumento de pH.[41]

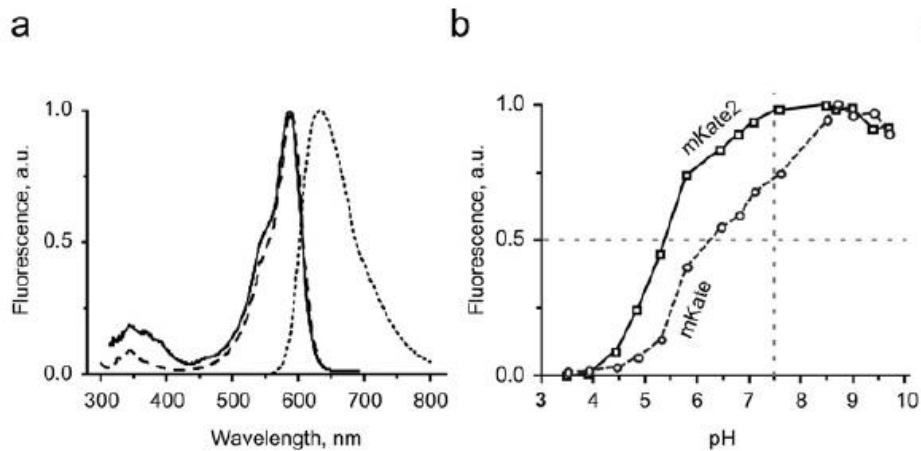
Analizando estos isómeros se encontró que la posición Ser148 estabiliza la conformación *cis*, común en la mayoría de las proteínas rojas fluorescentes, mientras que la conformación *trans* se estabiliza por Ser165, encontrándose principalmente en las cromoproteínas no-fluorescentes y es similar a eqFP611.

Al realizar mutagénesis a saturación de la posición 165, la sustitución S165A dio como resultado una mutante más fluorescente y de maduración más rápida. Otras mutaciones que resultaron benéficas para la maduración de la proteína fueron V48A y K238R. Con estos cambios se obtuvo una proteína de maduración rápida, mucho más brillante, monomérica que se nombró mkate2.[42]

Los perfiles espectrales de mKate2 son casi idénticos a los de mKate (Figura 12a), con excitación y emisión alcanzando un máximo de 588 y 633 nm, respectivamente. En comparación con mKate, la fluorescencia de mKate2 es mucho más estable a pH (Figura 12b), aumentando así su brillo a pH fisiológico y haciendo mKate2 un reportero más confiable para la adquisición de imágenes en organelos ácidos, tales como los endosomas, lisosomas tardíos y de reciclaje. Por tanto, mKate2 resultó ser una proteína monomérica,

fluorescente en el rojo lejano, casi 3 veces más brillante que la mKate original y 10 veces más brillante que mPlum.[42].

Sin embargo, resultados encontrados en nuestro laboratorio mostraron que cuando mKate y mKate2 son excitadas con luz azul a 470 nm, además del pico de emisión rojo principal localizado a 615 nm (no 630 nm como el reportado en la literatura),[42] también presentan un pico de emisión verde centrado en 504 nm, generado por un cromóforo tipo GFP que no logra madurar hasta el cromóforo tipo RFP. Este contaminante de las proteínas mKate representa una limitante para su uso, sobre todo cuando se requiere monitorear dos eventos a la vez en una célula, donde uno de ellos es rastreado por marcaje con la proteína verde fluorescente original cuya emisión está centrada entre 504-508 nm. Por esta razón, en este proyecto de tesis nos propusimos simplificar el espectro de emisión de la proteína mKate2 a través de ingeniería de proteínas y evolución dirigida, en forma similar a la simplificación del espectro de mCherry a partir del monómero mRFP1.4.[31]



**FIGURA 12. (a)** Espectros normalizados de absorción (línea continua), excitación (----) y emisión (····) de la proteína pura mKate2. **(b)** Estabilidad de fluorescencia a diferentes pHs de las proteínas mKate2 (línea continua) y mKate (línea discontinua).

## 2.2. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS Y EVOLUCION DIRIGIDA

La ingeniería de proteínas integra la información sobre la estructura, secuencia, mecanismo de reacción, función y propiedades bioquímicas, para diseñar y generar variantes de proteínas de forma racional, con la intención de mejorar alguna de sus características en particular. Normalmente, en este tipo de estudio se diseñan cambios específicos que se introducen modificando el gen que codifica la proteína de interés, por medio de mutagénesis sitio

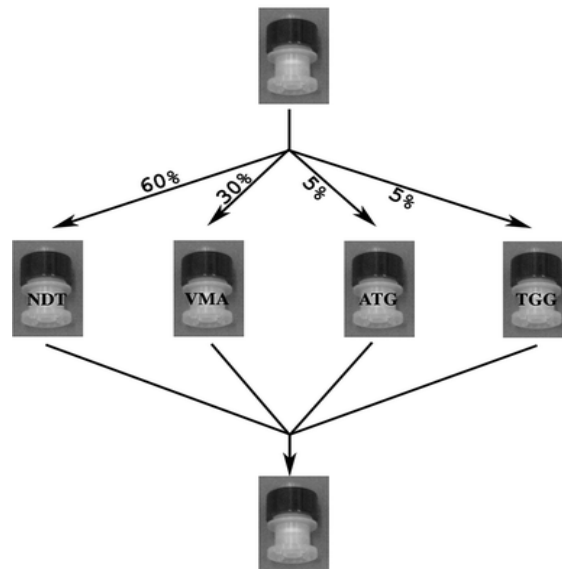
dirigida utilizando PCR (reacción en cadena de la polimerasa) sobre alguno o varios aminoácidos (Blundell et al, 1994)[43]

Una alternativa a la ingeniería de proteínas por mutagénesis sitio dirigida es la evolución dirigida, donde el principio de la evolución darwiniana que involucra ciclos repetidos de mutación, recombinación y selección puede ser aplicado y acelerado en el laboratorio para generar proteínas mejoradas. Para la evolución dirigida, ya sea *in vivo* o *in vitro* es necesario tener tres componentes: primero, un método para generar la diversidad genética; segundo, una vía para enlazar el genotipo al fenotipo y finalmente un método que permita identificar aquellas variantes con la actividad deseada. Para someter una proteína a un proceso de evolución *in vitro* se generan los genes mutados por alguna metodología adecuada, como por ejemplo la PCR propensa a errores. La biblioteca de genes mutados es clonada en un vector y transformada en una cepa hospedera. Finalmente, los componentes de la biblioteca son sometidos a un proceso de identificación que puede ser selección o búsqueda diferencial de aquellas mutantes con la característica que se quiere modificar. Este proceso se repite por varios ciclos para acumular mutaciones benéficas (Arnold F. et al, 1997)[44]

La mutagénesis dirigida por oligonucleótidos degenerados es otro método comúnmente utilizado para la preparación de variantes de un polipéptido o proteína de interés. Oligonucleótidos de composición mixta se están utilizando cada vez más para generar bibliotecas de variantes para el estudio de función biomolecular, en la búsqueda de péptidos y proteínas con propiedades mejoradas. En la preparación de las bibliotecas proteicas, generalmente el objetivo es introducir los 20 aminoácidos en posiciones predeterminadas de la proteína. Aunque los esquemas de síntesis química de oligonucleótidos se han diseñado para mejorar la eficiencia de este proceso, hay un límite en la precisión con la que los mononucleótidos se pueden mezclar, y debido a la degeneración del código genético, sólo es posible tener un control limitado sobre la distribución de aminoácidos.[26] Además, los aminoácidos no deseados y codones de paro a menudo no se pueden evitar. La ruta más directa para una mutagénesis controlada es el uso de mezclas de trinucleótido-fosforamiditos durante la síntesis de oligonucleótidos, que corresponden directamente a los codones de los aminoácidos necesarios.[26, 45-50] Sin embargo, aunque estos reactivos son comerciales, su costo sigue siendo elevado. Otra forma de evitar codones de paro y codones redundantes durante la síntesis de oligonucleótidos degenerados consiste en dividir el soporte de síntesis en cuatro porciones diferentes como se muestra en la **Figura 13**: 60%, 30%, 5% y 5%. La primer porción es acoplada con el codón degenerado NDT (N: A+G+C+T, D: A+G+T), generando los codones AAT, AGT, ATT, GAT, GGT, GTT, CAT, CGT, CTT, TAT, TGT, TTT, los cuales codifican a los 12 aminoácidos asparagina (Asn), serina (Ser), isoleucina (Ile), aspártico (Asp), glicina (Gly), valina (Val), histidina (His), arginina (Arg), leucina (Leu), tirosina (Tyr), cisteína (Cys) y fenilalanina (Phe) respectivamente. La segunda porción es acoplada con el codón degenerado VMA (V: A+C+G, M: A+C), generando la mezcla de 6 codones AAA, CAA, GAA, ACA, CCA y GCA, los cuales codifican a los 6 aminoácidos

lisina (Lys), glutamina (Gln), glutámico (Glu), treonina (Thr), prolina (Pro) y alanina (Ala), respectivamente. Finalmente, la tercera y cuarta porción son acoplados de manera independiente con los codones ATG y TGG para codificar los dos aminoácidos faltantes metionina (Met) y triptófano (Trp). Concluida la síntesis en las cuatro columnas, los soportes se mezclan y se vuelven a dividir en la misma proporción si se desea modificar otro codón, como se ejemplificó con la proteína mKate en la región del cromóforo, para los aminoácidos fenilalanina 62 (Phe62), metionina 63 (Met63) y tirosina 64 (Tyr64) (Gaytán et al, 2013)[51].

The resin-splitting procedure and DNA synthesis to perform the elimination of redundant and stop codons during the assembly of degenerate oligonucleotides.



**FIGURA 13.** Método de separación de resina para la síntesis de bibliotecas de oligonucleótidos degenerados a saturación.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La proteína roja fluorescente mKate2, al excitarse a 474 nm, longitud de onda óptima de excitación de GFP, genera un espectro de emisión con un pico principal centrado en 510 nm, característico del cromóforo tipo GFP, y otro pico más pequeño centrado en 615 nm correspondiente al cromóforo tipo RFP. La presencia del cromóforo tipo GFP significa que se trata de un intermediario que no logra madurar hasta el cromóforo RFP. Este contaminante de la proteína mKate2 representa una limitante para su uso, cuando se requiere monitorear dos eventos a la vez en una célula, donde uno de ellos es rastreado por marcaje con la proteína verde fluorescente original cuya emisión está centrada entre 504-508 nm. Por tanto, es necesario aplicar la ingeniería de proteínas a mKate2 para tratar de eficientizar la maduración del cromóforo rojo y eliminar el pico correspondiente al cromóforo intermediario verde.

#### **4. HIPOTESIS**

Para tratar de eliminar el pico de emisión indeseable en mKate2, correspondiente al cromóforo intermediario tipo GFP, se debe construir la mutante sitio-dirigida mKate2-M160Q, en analogía a lo que se hizo con la proteína mRFP1.4 precursora de la proteína roja fluorescente mCherry, la cual ya no presenta el pico de emisión verde.[52] Esta opción parece ser viable porque mCherry y mKate presentan una homología de 53% a nivel de secuencia de aminoácidos, y tanto mKate como mRFP1.4 contienen el aminoácido metionina en la posición 160.

Sin embargo, en caso de no obtener el resultado esperado, se deben reemplazar de manera combinatoria los aminoácidos metionina 160 (Met160), serina 143 (Ser143) y alanina 158 (Ala158), los cuales se encuentran muy cerca del cromóforo de acuerdo al análisis de la estructura cristalográfica de mKate2. Probablemente alguna o algunas sustituciones de estos residuos lograrán desaparecer el pico de emisión verde.



#### 4.1. JUSTIFICACIÓN

mKate2 es una proteína roja fluorescente, monomérica, que emite luz en el rojo lejano y que madura más rápido y posee mejores propiedades fluorescentes que la proteína mCherry, la proteína roja más utilizada hasta el momento para marcar otras proteínas de interés o llevar a cabo experimentos de expresión génica. Sin embargo, la maduración de mKate hasta el cromóforo tipo RFP es incompleta, quedando presente un intermediario tipo GFP que debería transformarse completamente hasta el cromóforo final RFP, para que la proteína pueda tener mayor aplicación en experimentos de multimarcaje.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Eficientizar la maduración del cromóforo rojo en la proteína roja fluorescente mKate2 a través de la mutación sitio-dirigida M160Q, o a través de mutagénesis combinatoria sitio-dirigida a los residuos serina 143 (Ser143), alanina 158 (Ala158) y metionina 160 (Met160) que se localizan cerca del cromóforo en el interior del barril.

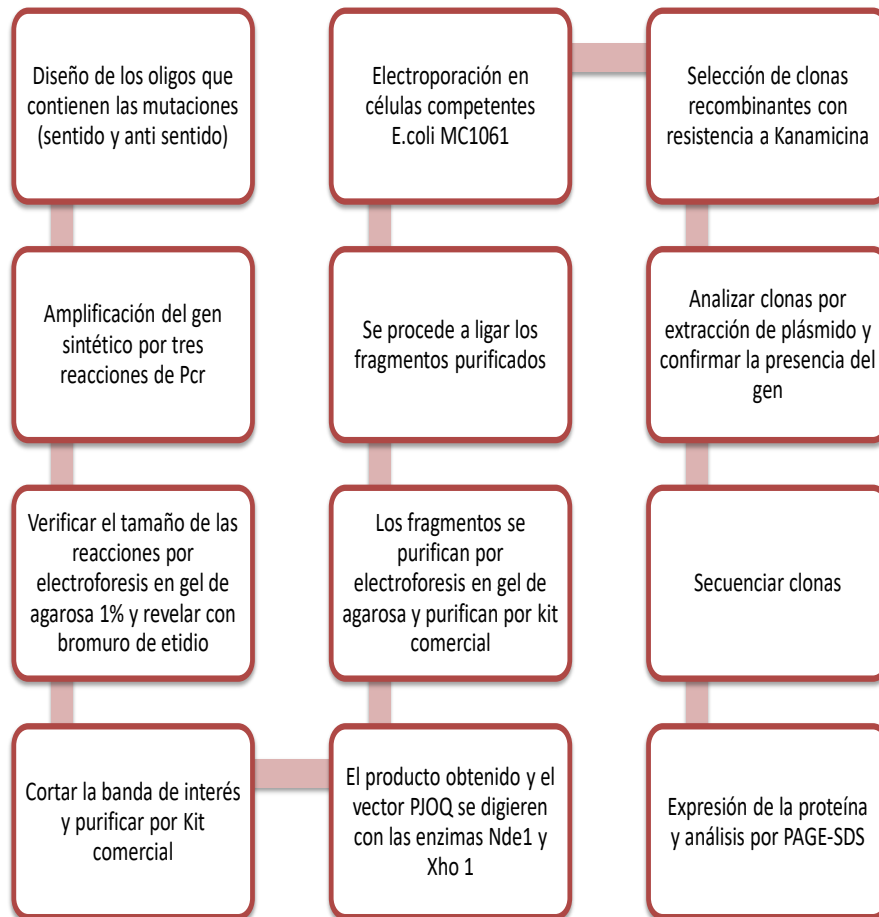
### 5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Diseñar y sintetizar químicamente un par de oligonucleótidos complementarios para llevar a cabo la mutación sitio dirigida M160Q en el gen que codifica a la proteína mKate2, a través de PCR.
2. Clonar el gen mutante mKate2-M160Q usando técnicas ordinarias de Biología Molecular y determinar y analizar los espectros de absorbancia, excitación y emisión de la proteína resultante. En caso de que el pico correspondiente al cromóforo tipo GFP haya desaparecido, el proyecto estaría concluido. Sin embargo, en caso de no desaparecer, pasaríamos al siguiente objetivo.
3. Diseñar y sintetizar químicamente un oligonucleótido degenerado, reemplazando los codones silvestres de los aminoácidos Ser143, Ala158 y Met160 por una mezcla de 20 codones diferentes, para generar una biblioteca de 8000 variantes proteicas.
4. Generar por PCR traslapada una genoteca del gen mKate2, usando el oligonucleótido degenerado mencionado en el tercer objetivo específico.
5. Clonar la genoteca en el plásmido pJOQ usando técnicas de Biología Molecular y transformar la cepa MC1061 de *Escherichia coli* con la ligación resultante de la genoteca y el plásmido. Cultivar las transformantes en cajas petri de LB / kanamicina.
6. Visualizar las colonias fluorescentes sobre un transiluminador de luz azul, aislar y secuenciar el gen recombinante de todas las mutantes con fenotipo fluorescente interesante. En especial, aquellas colonias que a simple vista se vean rojas pero que al excitarse con luz azul no fluorescan.
7. Purificar las proteínas mutantes fluorescentes más interesantes por cromatografía de afinidad a níquel y determinarles sus propiedades fotoquímicas.

## 6. METODOS Y MATERIALES

### 6.1. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la realización del presente trabajo se usaron diversas técnicas de biología molecular para construir, clonar y expresar mutantes de la proteína fluorescente mkate2 con la composición de aminoácidos deseada. La estrategia experimental se muestra en la Figura 14.



**FIGURA 14.** Estrategia experimental

## 6.2 OLIGONUCLEOTIDOS SINTETICOS

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se sintetizaron en la unidad de síntesis del IBt-UNAM, mediante el método de fosfitotriéster en fase sólida, a través de una estrategia llamada separación de resina (Figura 13).[45]

El ensamble se llevó a cabo en un sintetizador automático de ADN, modelo 394 de Applied Biosystems, provisto de cuatro columnas (**Figura 15**). Dicho sintetizador está equipado con 8 viales para fosforamiditos: los primeros cuatro se cargaron con las bases independientes dA, dC, dG y dT, disueltos en acetonitrilo a concentración 80 mM. Estas mismas soluciones se utilizaron para preparar las siguientes mezclas de bases, tomando 1 mL de cada una de las bases independientes: N (dA+dG+dC+dT), D (dA+dG+dT), V(dA+dC+dG) y M (dA+dC). Las demás posiciones fueron cargadas con los siguientes reactivos: ETT (5-ethylthio-1H-Tetrazol 0.25 M en acetonitrilo), Ac<sub>2</sub>O (anhídrido acético / tetrahydrofurano 1:9), NMI (N-metilimidazol / piridina / tetrahydrofurano 1:1:8), TCA (ácido tricloroacético 2% en diclorometano), I<sub>2</sub> (Iodo 20 mM en tetrahydrofurano / piridina / agua 8:1:1), acetonitrilo y acetona.



**FIGURA 15.** Sintetizador de ADN implementado para el ensamble de oligonucleótidos degenerados por el método de separación de resina.

Oligonucleótido mutagénico PrFw-SAM (S143X/A158X/M160X):

5'-G AAAAACTCGGCTGGGAAGCC tcc ACGGAGATGCTGTACCCGGCT  
GATGGTGGCCTTGAAGGTCGT gcg GAC atg GCCCTGAAACTCGTGGGTG-3'

- 1.- La síntesis se inició con 15 mg de soporte dG con porosidad de 2000 Å, ensamblando la secuencia 5'GCCCTGAAACTCGTGGGTG 3' en una sola columna (marcada como 1) y dejándola en modalidad tritilada (Trytil-on).
- 2.- Una vez concluida la síntesis del primer fragmento, la columna 1 se abrió y el soporte fue resuspendido en 200 µL de etilenglicol. 60 µL se transfirieron a la columna 2, mientras que 10 µL se transfirieron a las columnas 3 y 4, dejando el resto del soporte en la columna 1. El sobrenadante de etilenglicol de cada columna se retiró por succión con una jeringa para insulina.
- 3.- Cada columna se cerró y fue colocada en el sintetizador. A la columna 1 se le adicionó la mezcla de codones degenerados NDT, a la columna 2 la mezcla VMA, mientras que a las columnas 3 y 4 los codones específicos ATG y TGG respectivamente.
- 4.- Una vez concluida la síntesis en las cuatro columnas, éstas se abrieron y se reunieron todos los soportes en una sola columna.
- 5.- Se adicionó la secuencia GAC a todo el oligonucleótido creciente y nuevamente se dividió la resina en cuatro porciones como se describe en el paso 2 y se adicionaron los codones mencionados en el paso 3.
6. Se repitió el paso 4 y se adicionó la secuencia ACG GAG ATG CTG TAC CCG GCT GAT GGT GGC CTT GAA GGT CGT a todo el oligonucleótido creciente.
7. Se repitieron los pasos 2, 3 y 4 y se adicionó la secuencia GAAAACACTCGGCTGGGAAGCC a todo el oligonucleótido.

El oligonucleótido mutagénico, así como su oligonucleótido parcialmente complementario (GGCTTCCCAGCCGAGTGTTTTC, PrRv-SAM) se desprotegeron de manera independiente con 750 µL de hidróxido de amonio concentrado, se incubaron a 55°C durante 12 h, y se purificaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida al 12%.

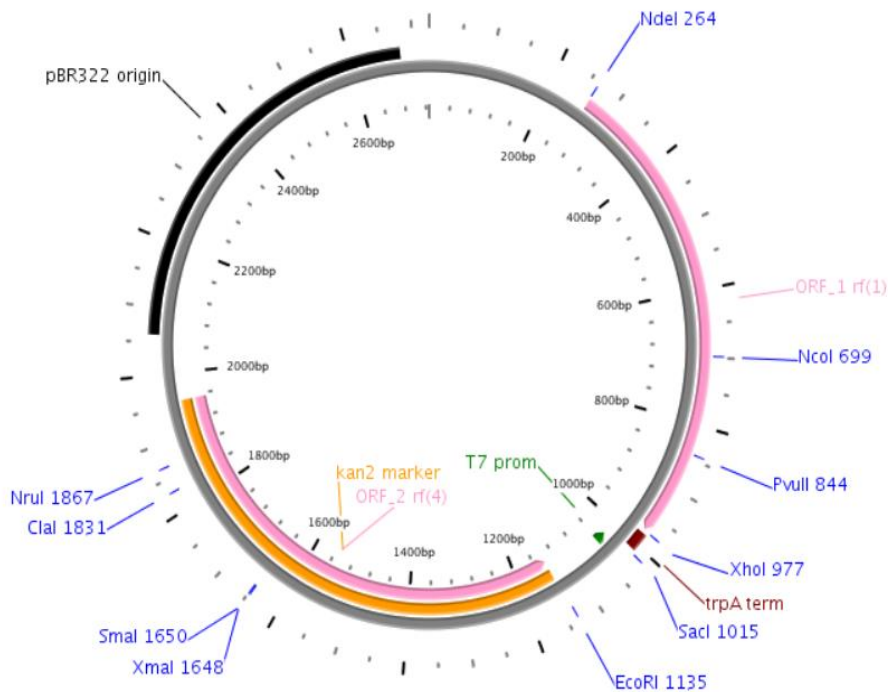
También se sintetizaron otros dos oligonucleótidos convencionales que aparean en la región del vector de clonación pJOQ, flanqueando los sitios de restricción de clonación NdeI y XhoI.

Primer pJOQFw: 5'-CGGTTCTGGCAAATATTCTG-3'

Primer pJOQRv: 5'-ACTCACTATAGGGCGAATTG-3'

### 6.3. VECTOR DE CLONACIÓN

Para la clonación y expresión del gen mkate y sus mutantes se utilizó el vector pJOQ, cuyo mapa genético se muestra en la Figura 16.[53]



**FIGURA 16.** Mapa genético del vector de clonación pJOQ.

El gen mKate2 fue clonado en el plásmido no comercial pJOQ, generosamente donado por el Dr. Joel Osuna Quintero. Este vector de solo 2018 bp fue construido con parte del vector comercial pET-28a y parte del plásmido pTRC99a. Contiene el gen de resistencia a kanamicina (Km), el origen de replicación del plásmido pBR322 y todos los genes clonados como insertos NdeI/XhoI son transcritos a partir del promotor *trc*. El plásmido que expresa el gen mKate2 está compuesto por 2726 bp como se muestra en el mapa. Todos los genes clonados en pJOQ se expresan constitutivamente porque el plásmido no contiene el represor codificado por el gen *lacI* y debido al origen de replicación es un vector de alto número de copias.[53]

#### 6.4. CEPA MICROBIANA

La cepa empleada en este trabajo fue *Escherichia coli* MC1061, la cual contiene el siguiente genotipo:

$F^-$ , *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7696, *galE15*, *galK16*,  $\Delta$ (*lac*)X74, *rpsL* (Str<sup>R</sup>), *hsdR2* (*rK*<sup>-</sup> *mK*<sup>+</sup>), *mcrA*, *mcrB1*

## 6.5. MEDIOS DE CULTIVO

Luria-Bertani líquido (LB):

Extracto de levadura (BD DIFCO): 5 g

Cloruro de sodio (J.T.Baker): 5 g

Triptona (BD DIFCO): 10 g

Agua: 1 L

Luria-Bertani sólido (LB):

1L de LB más 15 g de agar (BD DIFCO)

Super Optimal Broth (SOB):

Triptona (BD DIFCO): 2 g

Extracto de levadura (BD DIFCO): 500 mg

Cloruro de sodio 1M: 1 mL

Cloruro de potasio 1M: 0.25 mL

Agua: 100 mL

## 6.6. ANTIBIÓTICO

Kanamicina 30 mg/mL. 300 mg de sulfato de kanamicina (SIGMA) se disuelven en 10 mL de agua miliQ estéril. La solución se filtra con jeringa y filtro estériles de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  de poro, guardándose a 4°C hasta su uso.

## 6.7. CONSTRUCCIÓN DE LA GENOTECA

Para la construcción del banco de genes mutantes (genoteca) SAM/XXX se usó la técnica de PCR traslapada, consistente en hacer dos PCRs parciales cuyos productos se traslapan en algunas bases. En la PCR final los dos productos parciales se mezclan y amplifican con los oligos externos (pJOQfw y pJOQrv) para reconstruir los genes completos como se muestra en la Figura 17.

PCR 1 (PCR 2):

Primer SAM 10  $\mu\text{M}$  (Primer reverso SAM 10  $\mu\text{M}$ ): 4  $\mu\text{L}$

Primer pJOQrv 10  $\mu\text{M}$  (Primer pJOQfw 10  $\mu\text{M}$ ): 4  $\mu\text{L}$

Templado pJOQ-mKate2 (40 ng/ $\mu\text{L}$ , p8779): 2  $\mu\text{L}$

Buffer 10X: 10  $\mu\text{L}$

MgCl<sub>2</sub> 100 mM: 1  $\mu\text{L}$

dNTPs 4 mM: 10  $\mu\text{L}$

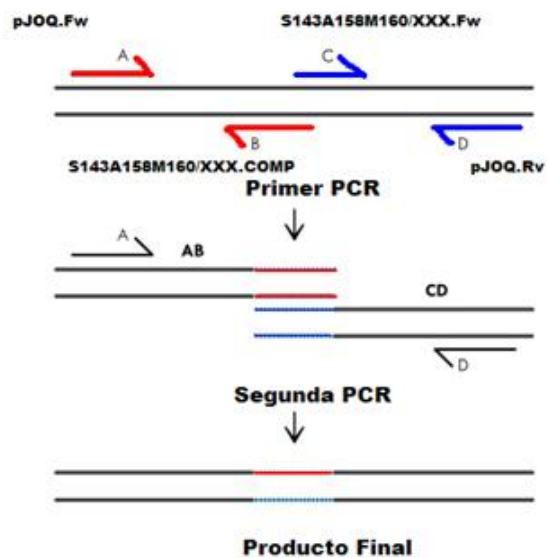
Enzima Vent DNA polimerasa (2 U/ $\mu$ L)	1.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O:	67.5 $\mu$ L

PCR 3:

PCR 1 purificada (20 ng/ $\mu$ L):	2 $\mu$ L
PCR 2 purificada (20 ng/ $\mu$ L):	2 $\mu$ L
Primer pJOQfw 10 $\mu$ M:	4 $\mu$ L
Primer pJOQrv 10 $\mu$ M:	4 $\mu$ L
Buffer 10X:	10 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 100 mM:	1 $\mu$ L
dNTPs 4 mM:	10 $\mu$ L
Enzima Vent DNA polimerasa (2 U/ $\mu$ L):	1.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O:	65.5 $\mu$ L

En los tres casos se usaron las siguientes condiciones de PCR:

1 ciclo:	95 °C --- 5 min
25 ciclos:	95 °C --- 1 min
	58 °C --- 1 min
	72 °C --- 1 min
1 ciclo:	72 °C --- 5 min



**FIGURA 17.** Estrategia de PCR traslapada para la construcción de la genoteca. La región modificada con los oligonucleótidos mutagénicos está representada por las líneas



discontinuas. El oligonucleótido mutagénico C y el oligonucleótido B son complementarios en sus extremos 5'. El oligonucleótido mutagénico C contiene las mutaciones hacia el extremo 3'. Los oligonucleótidos A y D son externos al gen.

#### 6.8. ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Se prepara una solución de agarosa al 1% con amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE 1X), la cual se calienta en horno de microondas hasta su disolución total y se vierte en la charola molde; se coloca el peine para formar los pozos y se deja gelificar a temperatura ambiente por 30 min. Después se coloca la charola en la cámara de electroforesis y se agrega buffer TBE 1X, se colocan las muestras en los pozos (5 µl de muestra mezclada con 2 µl de colorante de carga), así como la mezcla de estándares de pesos moleculares conocidos. La electroforesis se corre a 100 V y el gel, teñido con bromuro de etidio al 0.01%, se observa sobre un transiluminador de luz UV de longitud de onda larga a fin de analizar el tamaño de los productos de ADN generados por PCR.

#### 6.9. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR A PARTIR DE GEL

Los productos de ADN generados en las PCRs parciales se purificaron por el kit comercial Bio Basic Inc. (EZ Spin column DNA Gel Extraction Kit), para lo cual, la mezcla de reacción se corrió primero en gel preparativo de agarosa, se localizó la banda deseada por tinción con bromuro de etidio, se cortó con navaja de afeitar y se colocó en un tubo tipo eppendorf. Posteriormente, se continuó con la purificación del producto de ADN siguiendo las instrucciones del manual de usuario que proporciona el fabricante, descrito en el **Anexo N°1**. Este paso de purificación elimina el templado, los oligos que se hayan adicionado en exceso y las sales usadas en los buffers de reacción.

El producto de la PCR final se semipurifica por otro kit, llamado “EZ-10 Spin column for PCR products”, a través del protocolo de desalado descrito en el **Anexo N°2**. Este proceso elimina las sales del buffer utilizado en la reacción de PCR, los oligos sobrantes y los subproductos pequeños de ADN generados en la reacción.

#### 6.10. CLONACIÓN

Los productos de las reacciones de PCR son moléculas lineales de ADN de doble cadena, que normalmente contienen unos cientos o miles de pares de bases nucleotídicas. Pero lo más importante es que contienen los cambios nucleotídicos en las posiciones deseadas, y muchas veces contienen secuencias específicas en los extremos que son reconocidas por enzimas de restricción, permitiendo continuar con el proceso de clonación en “cromosomas” circulares

pequeños de ADN llamados vectores o plásmidos, los cuales contienen toda la información genética para autorreplicarse dentro de las células y expresar los genes clonados en ellos. El producto de la PCR final, así como el plásmido pJOQ se someten de manera independiente a una doble digestión con las enzimas de restricción NdeI (aislada de *Neisseria denitrificans*) y XhoI (aislada de *Xanthomonas campestris* pv. *Holcicola*), usando las siguientes cantidades de reactivos:

Enzima Nde I (20 U/ $\mu$ l):	1.5 $\mu$ L
Enzima Xho I (20 U/ $\mu$ l) :	1.5 $\mu$ L
buffer 4 de NEB, 10X:	8.0 $\mu$ L
Muestra (producto de pcr o plásmido):	2-3 $\mu$ g disuelto en agua
Agua:	c.b.p. 80 $\mu$ l de reacción

La mezcla de reacción se prepara sobre hielo, agregando las enzimas al final y mezclando suavemente con la mano, sin agitar en el vortex. La mezcla de reacción se incuba a 37°C por 14 horas.

Una vez digeridos ambos productos, los cuales contienen extremos cohesivos complementarios, se procede a su purificación en gel de agarosa al 1% utilizando el kit comercial Bio Basic Inc. (EZ Spin column DNA Gel Extraction Kit), siguiendo el protocolo descrito en el **Anexo N°1**.

#### 6.11. LIGACIÓN

Los productos purificados son ligados con la enzima T4 ADN ligasa para generar un plásmido cerrado relajado que contiene al gen codificante de la proteína recombinante.

Componentes de la reacción:

Buffer T4 DNA ligasa 10X	2 $\mu$ L
T4 DNA Ligasa (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ L
Vector de ADN	200 ng
Inserto de ADN	200 ng
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 20 $\mu$ L

Mezclar suavemente la reacción e incubarla en hielo durante 16 h, empezando a 8°C y terminando a 22°C

#### 6.12. TRANSFORMACIÓN

A continuación, la ligación es usada para transformar células electrocompetentes de la cepa bacteriana *E.Coli* MC1061, preparadas como se describe en el **Anexo N°5**. Para la transformación, las células guardadas a -72°C se descongelan sobre hielo normal por 20 min, se transfieren a una celda de electroporación de 100  $\mu$ L, se les adiciona 1.5  $\mu$ L de la reacción de ligación y se colocan en el portacelda de un electroporador. Las células se someten a un

choque eléctrico de 1.8 Kvolts, se retira la celda y el contenido se recupera con 1 mL de medio de cultivo SOB, incubando 1 h a 37°C, bajo agitación a 200 rpm. Durante este período de espera se preparan placas de medio LB con kanamicina y se dejan secar aproximadamente 1 hora. Posteriormente, se toman 200 µl de la transformación y se siembran en las placas selectivas, incubándolas a 37°C por 20 h.

### 6.13. SELECCIÓN DE MUTANTES

Al siguiente día, las cajas se visualizan sobre un transiluminador de luz azul (470 nm) y se seleccionan las colonias que muestren un fenotipo interesante. Sobre todo, aquellas colonias que a simple vista se vean muy rojas y que no brillen cuando se irradian con la luz azul, lo cual estaría indicando ausencia del cromóforo tipo GFP, que se excita específicamente con este tipo de luz. Las colonias elegidas se utilizan para inocular 5 mL de LB líquido y los cultivos se incuban 20 h a 37°C, con agitación a 200 rpm. Al siguiente día, se recupera plásmido de cada uno de los cultivos (**Anexo N°6**) y se determina su secuencia de forma automatizada por el método de terminador de cadena tipo Sanger.

Los datos obtenidos son analizados por el programa bio informático disponible en línea BioEdit. Con este programa se analizan los archivos recibidos, los cuales muestran electroferogramas conteniendo las secuencias nucleotídicas, que a su vez se convierten en secuencias de aminoácidos para determinar de manera indirecta la estructura primaria de las proteínas codificadas.

### 6.14 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Preparar pre-inóculos “overnight” de 5 ml de cada una de las mutantes seleccionadas, creciéndolas a 37°C bajo agitación a 200 rpm.

Utilizar los pre-inóculos para inocular 1 L de LB/Km en matraces Fermbach. Incubar a 37°C por 24 horas, bajo agitación a 200 rpm.

Centrifugar los cultivos a 13000 rpm por 20 min, a 4°C. Desechar el sobrenadante.

Resuspender la pastilla celular en 35 mL de PBS 1X y sonicar la suspensión en tres pulsos de 3 min cada uno, con enfriamiento intermedio en hielo por 15 min.

Centrifugar la suspensión a 13000 rpm por 20 min y filtrar el sobrenadante a través de un filtro de nylon de 0.22 µm para jeringa.

Purificar la proteína por HPLC, pasando la solución por una columna HisTrap de 1 mL, empacada con resina de Níquel (Pharmacia), usando un gradiente de imidazol de 10 mM a 300 mM en 25 min, con una corrida isocrática previa de imidazol 10 mM por 12 min. Las soluciones de imidazol se preparan en buffer de fosfatos 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7.

Colectar las fracciones coloridas y reunir las en una sola fracción.

Concentrar la fracción y desalarla por centrifugación en tubos amicon con corte de 10 KDa de poro. Lavar la proteína con PBS 1X (2 x 4 mL) para eliminar el imidazol. Resuspender la proteína pura en 1-2 mL de PBS 1X.

#### 6.15 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de las proteínas se determina por el método de Bradford, el cual se basa en la formación de un complejo entre el colorante Azul Brillante G y las proteínas en solución. El complejo provoca un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm. La cantidad de absorción es proporcional a la proteína presente. Para determinar la concentración se realiza una curva de calibración estándar, usando 5 soluciones de BSA a distintas concentraciones conocidas, mezclando 10  $\mu$ L de muestra con 1 mL de la solución de Bradford diluida 1:1 con agua (Thermo Scientific). Se deja reaccionar por 5 minutos y las muestras se leen a 595 nm en un espectrofotómetro de absorción, usando una solución blanco de Bradford y PBS 1X, preparada igual que las muestras estándar y las muestras problema.

#### 6.16 ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La calidad de todas las variantes purificadas fue analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés) en condiciones desnaturalizantes, usando el detergente dodecilsulfato sódico (SDS) como agente caotrópico para la desnaturalización de las proteínas, tanto en el gel como en el buffer de corrida. También se usó  $\beta$ -mercaptoetanol para la ruptura de posibles enlaces disulfuros intermoleculares formados entre cisteínas vecinas. Sin embargo, el  $\beta$ -mercaptoetanol solo se usó en el colorante de carga. La electroforesis permite también estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido. La electroforesis para analizar proteínas utiliza dos geles: un gel concentrador de poros grandes y pH 6.8, y un gel separador de poros más pequeños y pH 8.8.

Para montar el sistema de electroforesis se utilizan dos placas, una de vidrio y otra de alúmina, así como dos separadores de plástico de 0.75 mm y clips reversibles de 25 mm para formar un sándwich de 8.3 cm x 11.0 cm x 0.75 mm.

Primeramente, se prepara el gel separador y se vierte suavemente en el “sándwich” vertical a través del borde superior. Los otros tres bordes se deben sellar con anticipación usando agarosa fundida, o colocando el “sándwich” en un molde comercial apropiado, sellando con bandas especiales de hule y presión. Detener el llenado 1-2 cm antes del borde superior. Dejar gelificar por aproximadamente 20-30 minutos.

#### GEL SEPARADOR:

Acrilamida 30%	3 mL
Buffer de tris 1.5M pH 8.8	2 mL
Agua milliQ	3 mL
TEMED	6 $\mu$ L
Persulfato de amonio	48 $\mu$ L

A continuación, el gel se lava con agua, se seca con papel filtro y se adiciona la mezcla de acrilamida que dará lugar al gel concentrador. Llenar hasta el borde superior e insertar un peine de teflón con los dientes suficientes que permitan generar los pozos necesarios para analizar las muestras deseadas. Dejar gelificar y retirar el peine bajo el chorro de agua.

#### GEL CONCENTRADOR:

Acrilamida 30%	300 $\mu$ L
Buffer de tris 1.5M pH 6.8	500 $\mu$ L
Agua milliQ	1.2 mL
SDS 10%	20 $\mu$ L
TEMED	3 $\mu$ L
Persulfato amónico	24 $\mu$ L

Las muestras se preparan con 2  $\mu$ L de proteína (1-5  $\mu$ g/ $\mu$ L), 13  $\mu$ L de buffer de corrida con SDS, 5  $\mu$ L de buffer de carga (40% glicerol, 20% buffer Tris pH 6.8%, 20%  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% SDS y una pizca de azul de bromofenol como colorante) y son hervidas por 5 min para desnaturalizar completamente la proteína.

Una vez aplicadas las muestras, los geles se corren con buffer Tris: glicina: SDS al 1%:1%:0.1% a 4 watts constantes.

Los geles se tiñeron con azul de coomassie al 0.001% en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% por 20 min. Finalmente, los geles se destiñeron con una solución de etanol al 20% y ácido acético al 5% por 1 h, con lo cual las proteínas se visualizaron como bandas azul marino en un fondo ligeramente azul.

Las mismas muestras también se analizaron en condiciones semi-desnaturalizantes, preparándolas igual que para el gel desnaturalizante, pero se cargaron sin hervir. Estas condiciones permiten analizar la posible formación de estructura cuaternaria entre las variantes.

#### 6.17. ESPECTROS DE ABSORBANCIA

Los espectros de absorción de luz UV-visible de las proteínas de interés se determinaron en un espectrofotómetro, diluyendo las muestras con buffer PBS 1X hasta que la absorbancia en el máximo de absorción se encontrara entre 0.1 y 0.5

Este ensayo permitió determinar el máximo de absorción de cada una de las proteínas variantes, el cual para un compuesto puro debe ser igual al máximo de excitación determinado en un espectrofluorímetro.

#### 6.18. ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN

La adquisición de los espectros de excitación-emisión se llevó a cabo en un espectrofluorímetro LB50 marca Perkin-Elmer, analizando 20  $\mu\text{L}$  de proteína cruda diluida con 580  $\mu\text{L}$  de buffer salino PBS 1X, o bien, 1  $\mu\text{L}$  de proteína pura diluida con 600  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. Para determinar el espectro de emisión, la longitud de onda de excitación se fijó en el máximo de absorción determinado previamente y se empezó a registrar la emisión 10 nm arriba, hasta 700 nm. Una vez determinado el máximo de emisión, este se fijó en el equipo y se empezó a registrar el espectro de excitación desde 350 nm hasta 10 nm abajo del máximo de emisión.

#### 6.19. DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR Y DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO

El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de las proteínas más interesantes se determinó en su máximo de absorción de luz visible. Para esta determinación se prepararon seis diluciones por duplicado, desde 0.5  $\mu\text{M}$  hasta 3.0  $\mu\text{M}$ , determinando su absorbancia en la longitud de onda máxima. Al graficar la concentración contra la absorbancia se obtiene una recta cuya pendiente representa  $\epsilon$  en unidades  $\text{uM}^{-1}$ .

Para determinar el rendimiento cuántico ( $\phi$ ) de cada una de las proteínas de interés, las diluciones usadas para medir  $\epsilon$  se diluyeron 25 veces con buffer PBS y se les midió la intensidad de emisión (en su máximo) cuando se excitaron en su máximo de absorción. Para las mediciones se usaron ventanas de excitación y emisión de 5 nm. Al graficar la absorbancia de las soluciones concentradas contra la fluorescencia de las soluciones diluidas se obtiene una línea recta con una pendiente X. Los mismos análisis de absorbancia y fluorescencia con la proteína parental mKate2 cuyo  $\phi$  reportado es 0.40, permiten determinar el rendimiento cuántico de las diferentes variantes dividiendo la pendiente X entre la pendiente obtenida con mKate2 y multiplicando por 0.40.[42]

## ANEXOS

### **1. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR POR GEL DE AGAROSA, USANDO EL KIT “EZ-10 SPIN COLUMN DNA GEL EXTRACTION”**

La reacción de PCR se mezcla con 15  $\mu$ L de buffer de carga (usando azul de bromofenol como colorante) y se carga en un gel preparativo de agarosa de bajo punto de fusión al 1%, usando buffer TBE 1X como buffer de corrida. El gel se corre a 100 volts y transcurridos 20 min se retira de la cámara de electroforesis, se tiñe en 50 mL de una solución de bromuro de etidio (EtBr) al 0.01 % en agua, por 3 min, se lava en agua varias veces para remover el exceso de EtBr y se corre otros 20 min en la cámara de electroforesis. El gel se retira de la cámara, se coloca sobre un transiluminador de luz UV de longitud de onda larga y la banda esperada (normalmente la más intensa) se corta con una navaja y se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 mL.

El trozo de gel se pesa en balanza analítica y por cada 100 mg de agarosa se adiciona 300  $\mu$ L de la solución de unión y disolución de agarosa (#1), del kit EZ-10.

La muestra se incuba a 55°C por 20 minutos para fundir la agarosa, agitándola en el “vortex” eventualmente.

La solución se transfiere a la columna de adsorción incluida en el kit, la cual se coloca en un tubo de recolección también incluido en el kit.

Centrifugar por 1 minuto a 13000 rpm, desechar el filtrado.

Adicionar a la columna de adsorción 500  $\mu$ L de la solución #2 y centrifugar por 1 min para lavar el producto adsorbido en la fase estacionaria. Tirar el filtrado y repetir el lavado una vez más.

Tirar el filtrado y centrifugar en seco para eliminar trazas de la solución 2.

Eluir el producto con 70  $\mu$ L de agua grado mili Q en un tubo colector nuevo.

Cuantificar por espectroscopía UV a 260 nm, utilizando 2  $\mu$ L de muestra directa en el Nano Drop ND-1000. Considerar que 1 OD de material recuperado equivale a 50 ng de ADN de doble cadena.

### **2. DESALIFICACION DE PRODUCTOS DE PCR POR EL KIT “EZ-10 SPIN COLUMN PCR PRODUCTS PURIFICATION KIT”**

1. Transferir la mezcla de reacción de PCR a un tubo de microcentrífuga eppendorf de 1.5 mL y añadir 300  $\mu$ L de la solución #1, correspondiente al buffer de unión.
2. La solución se transfiere a la columna de adsorción incluida en el kit, la cual se coloca en un tubo de recolección también incluido en el kit.
3. Centrifugar por 1 minuto a 13000 rpm, desechar el filtrado.
4. Adicionar a la columna de adsorción 500  $\mu$ L de la solución #2, correspondiente a la solución de lavado y centrifugar por 1 min para lavar el producto adsorbido en la fase estacionaria. Tirar el filtrado y repetir el lavado una vez más.
5. Tirar el filtrado y centrifugar en seco para eliminar trazas de la solución #2.

6. Eluir el producto con 70  $\mu$ L de agua grado mili Q en un tubo colector nuevo.
7. Cuantificar por espectroscopía UV a 260 nm, utilizando 2  $\mu$ L de muestra directa en el Nano Drop ND-1000. Considerar que 1 OD de material recuperado equivale a 50 ng de DNA de doble cadena.

### **3. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES DE *E. coli*.**

#### **Material**

- 1.- Medio LB bajo en sales. Disolver 4 g de triptona, 2 g de NaCl y 2 g de extracto de levadura en 400 ml de agua grado milli-Q.
- 2.- Preparar 500 mL de glicerol al 10%.
- 3.- Preparar 100 mL de GYT (Glicerol 10%, extracto de levadura 0.125% y triptona 0.25%).
- 4.- Colocar 60 tubos tipo eppendorf de 0.6 mL en un frasco de vidrio.
- 5.- 2 botes de 250 mL para centrifuga.

Los medios de cultivo, el material de vidrio, de plástico y las soluciones se esterilizan en una autoclave.

#### **Método**

- 1.- La cepa *E. coli* MC1061 se re-estría dos días seguidos en cajas de LB, incubándose a 37°C por 16 h.
- 2.- Se toma una colonia aislada y se inocula en un volumen de 4 mL de LB. Se incuba a 30°C por 16 h, bajo agitación a 200 rpm.
- 3.- El cultivo anterior se utiliza para inocular el LB de 400 mL al siguiente día y se deja crecer a 37°C hasta que alcance una densidad óptica aproximada de 0.6-0.9 a 600 nm. A continuación, se coloca el matraz en hielo por 10 min.
- 4.- En cada tubo para centrifuga se colocan 200 mL del cultivo y se centrifugan a 5000 rpm durante 10 min.
- 5.- Se retira el sobrenadante y el pellet se resuspende suavemente con 100 ml de glicerol al 10%, se centrifuga durante 10 min a 5000 rpm.
- 6.- Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet suavemente con 50 mL de glicerol al 10%. Se centrifuga durante 10 minutos a 5000 rpm.
- 7.- Se repite el paso anterior utilizando 25 mL de glicerol al 10%.
- 8.- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet con 500  $\mu$ L de glicerol al 10% y 500  $\mu$ L de GYT (ambos deben estar fríos).
- 9.- Se hacen alícuotas de 60  $\mu$ L, se congelan en hielo seco por aproximadamente 20 min y se almacenan a -70°C (todo se realiza en campana de flujo laminar).



#### 4. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO

Para verificar la construcción molecular correcta de cada una de las mutantes, tres colonias resultantes de cada transformación se incubaron a 37°C por 20 h, bajo agitación a 200 rpm, en 5 mL de LB conteniendo Kanamicina a 30 µg/mL. Para este proceso se usaron tubos de ensaye estériles desechables de 15 mL de fondo redondo.

El plásmido de cada uno de los cultivos fue recuperado y purificado usando el Kit para Purificación de Plásmidos de Roche, cuyo procedimiento se describe a continuación.

-Centrifugar el cultivo 5 min a 13000 rpm. Desechar el sobrenadante.

-Resuspender la pastilla celular en 250 µL del buffer de suspensión (solución #1) usando vortex.

-Adicionar 250 µL del buffer de lisis (solución #2) y agitar suavemente con la mano. Incubar a temperatura ambiente por 5 min.

-Añadir 350 µL de buffer de neutralización (solución #3) previamente enfriado, agitar suavemente con la mano e incubar en hielo por 5 min.

-Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm.

-Transferir el sobrenadante a una columna de adsorción desechable, de silica gel, contenida en el kit de purificación y centrifugar 1 min a 13000 rpm. Desechar el filtrado.

-Añadir 500 µL del primer buffer de lavado (solución #4) y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto. Desechar el filtrado.

-Repetir el paso anterior pero con 700 µL del segundo buffer de lavado (solución #5).

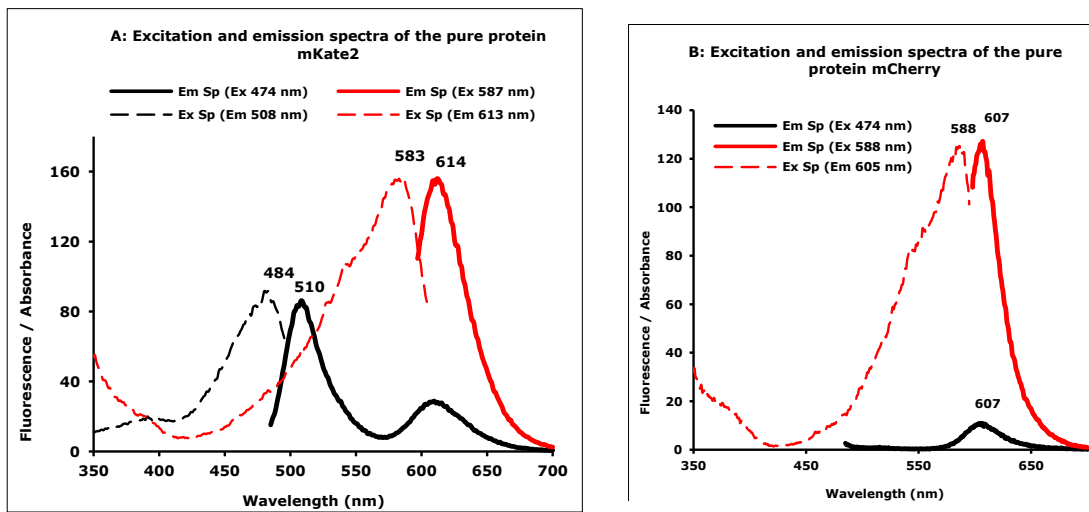
-Centrifugar en seco para remover cualquier traza de la segunda solución de lavado.

-Eluir el plásmido con 100 µL de agua desionizada, estéril, en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL.

-Cuantificar por espectroscopía UV a 260 nm, considerando que 1 OD de ADN de doble cadena equivale a 50 ng de material.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

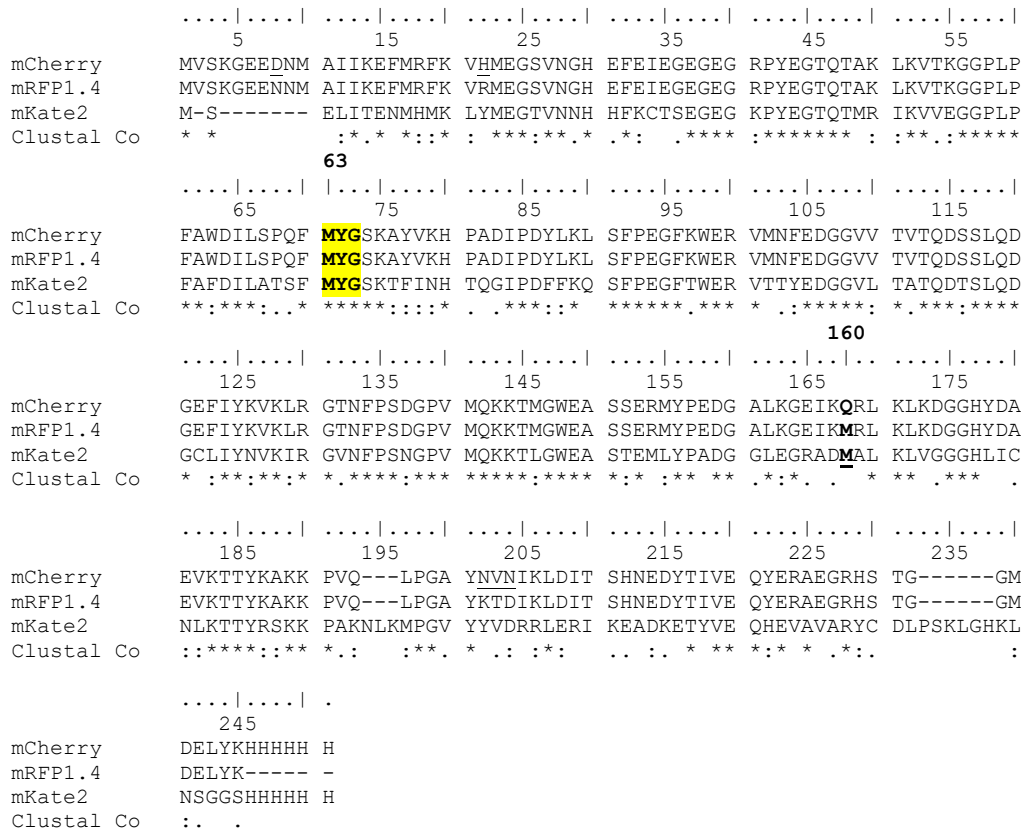
Según el reporte original, la proteína mKate2 es una proteína roja fluorescente que emite luz en la región lejana del espectro visible a 630 nm.[42] Es monomérica y fue generada a partir de la proteína tetramérica parental eqFP578, aislada de la anemona marina *Entacmaea quadricolor*. Sin embargo, tras sintetizar en nuestro laboratorio el gen que codifica a la proteína mKate2, clonarlo en un vector apropiado y expresar la proteína y purificarla, encontramos que la proteína efectivamente era roja pero el pico de emisión máxima estaba centrado en 615 nm (Figura 18) y no en 630 nm como se reportó originalmente. También encontramos que cuando la proteína se excita con luz azul a 474 nm, además del pico de emisión rojo se genera un pico de emisión verde (centrado alrededor de 510 nm) en proporciones 1:3 respectivamente, donde GFP representa un intermediario en la vía de maduración del cromóforo rojo como se ha reportado previamente para otras proteínas RFPs. [54] La presencia del intermediario puede ser un obstáculo en experimentos de multimarcaje donde uno de los marcadores sea GFP. Por tanto, en la presente tesis tratamos de eficientizar la maduración del cromóforo rojo de mKate2 a través de diferentes aproximaciones mutagénicas.



**FIGURA 18.** Espectros de excitación y emisión de las proteínas rojas fluorescentes mKate2 (A) y mCherry (B).

Para tratar de eliminar este pico de emisión indeseable en mKate2, en un primer experimento construimos la mutante sitio-dirigida mKate-M160Q, en analogía a lo que se hizo con la proteína mRFP1.4 precursora de la proteína roja fluorescente mCherry, la cual ya no presenta el pico de emisión verde como se observa en la Figura.[52]

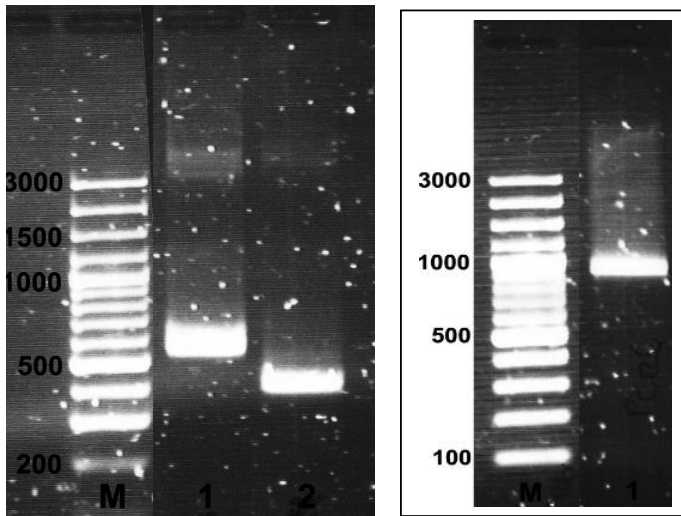
Se probó esta opción porque mCherry y mKate2 presentan una homología de 53% a nivel de secuencia de aminoácidos, y tanto mKate2 como mRFP1.4 contienen el aminoácido metionina en la posición 160 como se muestra en el alineamiento de la Figura 19.



**FIGURA 19.** Comparación entre las secuencias de mKate2, mCherry y mRFP1. Metionina 160 en la numeración secuencial de mKate2 equivale a metionina 168 en mRFP1.4. La mutación M168Q en mRFP1 hizo más eficiente la maduración del cromóforo rojo, reduciendo la presencia del intermediario tipo GFP en mCherry. Los aminoácidos formadores del cromóforo están resaltados en amarillo.

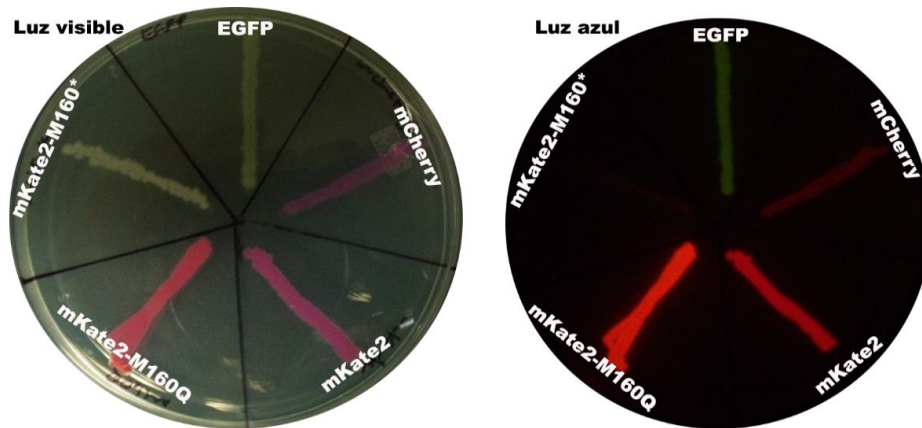
La mutante mKate2-M160Q se construyó por mutagénesis sitio dirigida usando el método de PCR traslapada, consistente en realizar tres reacciones de PCR. En las primeras dos PCRs se inserta la mutación deseada en el gen blanco a través de dos amplificaciones de ADN *in vitro*, usando oligonucleótidos específicos. En la primera PCR, usando el gen mKate2 como templado, la combinación de los oligonucleótidos pJOQfw y M160Q-rv generó un fragmento de 570 bp como se observa en el carril 1 del gel de agarosa mostrado en la Figura 20, mientras que en la segunda PCR, la combinación de los oligonucleótidos M160Q-fw y pJOQrv generó

un fragmento de 300 bp analizado en el carril 2. Estos dos fragmentos de ADN fueron purificados por gel preparativo de agarosa, se mezclaron, y en una tercer PCR se amplificaron de manera conjunta con los oligonucleótidos externos pJOQfw y pJOQrv, para generar un fragmento de 900 bp (carril 3) que contiene el gen mutante completo, además de los sitios de restricción NdeI en la terminal 5' y XhoI en la terminal 3'.



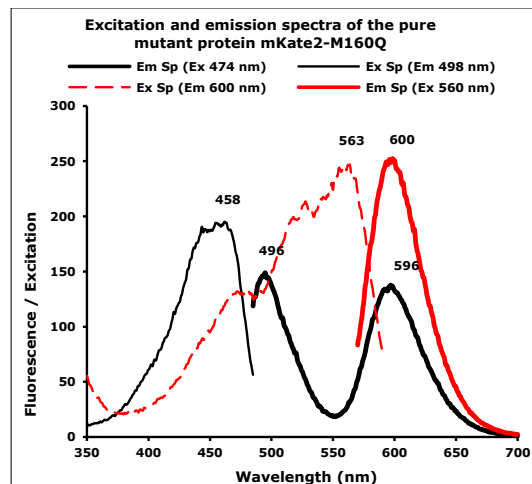
**FIGURA 20.** Gel de agarosa al 1% mostrando los fragmentos de ADN amplificados por las tres reacciones de PCR para ensamblar el gen mutante mKate2-M160Q. M: marcador de pesos moleculares. 1) PCR1, 2) PCR 2, 3) PCR 3.

El producto final (Figura 20B) se digirió con las enzimas de restricción NdeI/XhoI y se clonó en el vector procarionte pJOQ que contiene resistencia a kanamicina. Tras el proceso de transformación bacteriana, las colonias de *E. coli* que expresaron el gen mutante mostraron un fenotipo “rosa mexicano”, muy diferente al fenotipo “bugambilia” generado por la proteína parental mKate2 como se observa en la caja de petri mostrada en la Figura 21. Este resultado claramente indicaba que la mutación M160Q había generado un cambio en la función de la proteína parental.



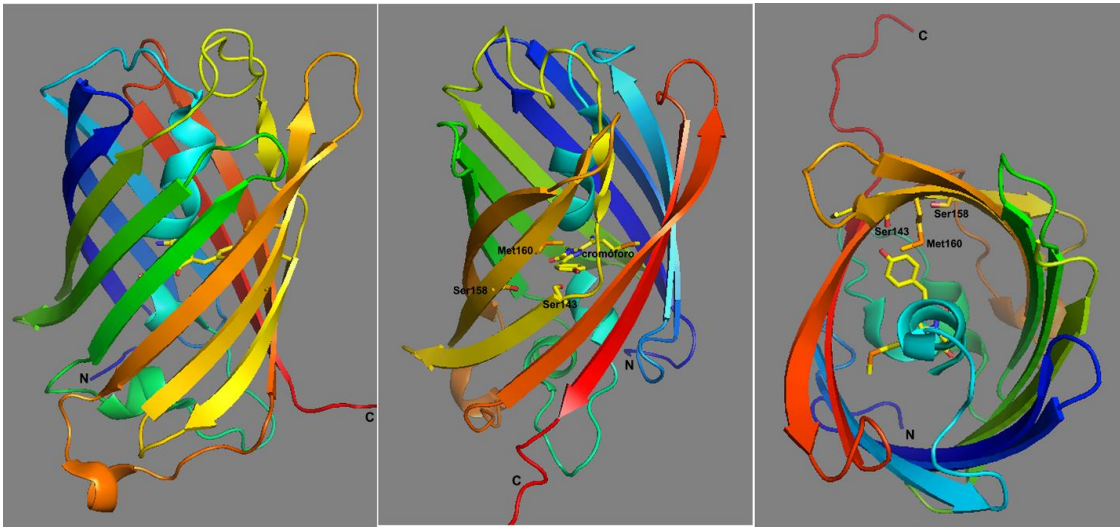
**FIGURA 21.** Fenotipo de bacterias *E. coli* expresando los genes fluorescentes EGFP, mCherry, mKate2, mKate2-M160Q y el gen no fluorescente mKate2-M160\*, cuya proteína codificada posee un codón de paro en la posición 160. Las cajas se fotografiaron bajo luz visible y bajo luz azul.

A continuación, la proteína heteróloga mKate2-M160Q fue purificada por cromatografía de afinidad usando una columna de Níquel y fue analizada por espectroscopía de fluorescencia (Figura 22). Claramente, la mutación M160Q en mKate2 redujo el pico de emisión verde en comparación con la proteína parental, prácticamente a nivel 1:1 con respecto a la proteína roja esperada, pero no lo desapareció. Esto significa que la maduración del cromóforo rojo fue más eficiente que en mKate2 y por tanto el efecto ocasionado por la mutación M160Q en mRFP1.4 para generar mCherry fue similar al ocasionado en mKate2, un resultado esperado en base a la homología de las secuencias, pero el pico verde no desapareció.



**FIGURA 22.** Espectros de excitación y emisión de la mutante mKate2-M160Q.

Al analizar la estructura cristalográfica de la proteína mKate2 (Figura 23),[41] observamos que el aminoácido metionina 160 (Met160) se localiza muy cerca del cromóforo, al igual que los aminoácidos serina 143 (Ser143) y alanina 158 (Ala158), lo cual los convertía en buenos candidatos para ser reemplazados al azar, a fin de encontrar alguna o algunas sustituciones que logran desaparecer el pico de emisión verde.

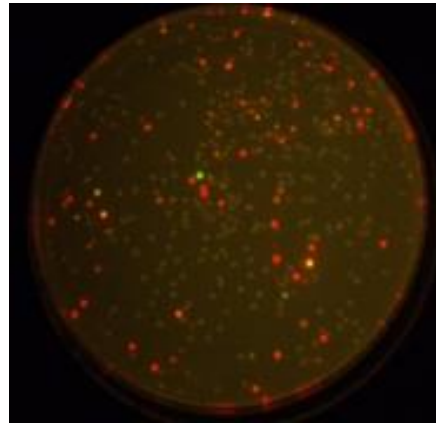


**FIGURA 23.** Estructura cristalográfica de la proteína mKate2, mostrando los aminoácidos cercanos al cromóforo.

Debido a que en el laboratorio contamos con la tecnología para realizar sustituciones de cualquier aminoácido silvestre por un conjunto de los 20 aminoácidos comunes,[45] descrita en la parte introductoria de esta tesis, se decidió aplicar esta aproximación para sustituir los tres aminoácidos al mismo tiempo a través del ensamble del oligonucleótido mutagénico PrFw-SAM, cuya síntesis describimos de manera detallada en la sección de materiales y métodos. Este oligonucleótido debía generar una biblioteca combinatoria de 8,000 proteínas variantes. Asimismo, fue necesario sintetizar un oligonucleótido parcialmente complementario a PrFw-SAM, al cual llamamos PrRv-SAM, para poder completar la estrategia de ensamble de la genoteca por PCR traslapada.

La biblioteca se ensambló en forma muy parecida a la mutante mKate2-M160Q. En la primer PCR se amplificó el par de oligos pJOQfw / PrRv-SAM, mientras que en la segunda PCR se amplificó el par PrFw-SAM / pJOQrv, usando en ambos casos el gen mKate2-M160\* como templado (\* representa un codón de paro). Para la tercer PCR, las dos primeras fueron purificadas, mezcladas en cantidades pequeñas y amplificadas con los oligonucleótidos externos pJOQfw y pJOQrv a fin de generar la genoteca completa. Tras clonar la biblioteca y expresarla en células de *E. coli*, se observó que aproximadamente 90 % de las colonias

presentaba fenotipo blanco, indicando que la mayoría de las mutaciones hicieron que los genes perdieran su función, ya sea porque las proteínas codificadas perdieron su capacidad de plegarse correctamente o porque afectaron la maduración del cromóforo (Figura 24). Sin embargo, el resto de las colonias presentaban fenotipo rojo, guinda, verde, amarillo y anaranjado.



**FIGURA 24.** Bacterias de *E. coli* expresando el banco de genes mutantes de mKate2 donde se reemplazaron al azar los codones que codifican a los aminoácidos serina 143, alanina 158 y metionina 160.

A continuación, seleccionamos 40 colonias por sus fenotipos coloridos y pusimos cultivos celulares de cada una de ellas, incubándolos bajo agitación a 37°C por 20 h. Una fracción de cada cultivo fue utilizada para extraer plásmido y secuenciar su ADN, a fin de conocer las mutaciones que generaron el cambio de fenotipo (Figura 25), mientras que otra fracción fue utilizada para adquirir sus espectros de excitación y emisión de luz (Figura 26), así como para analizar el nivel de expresión de cada una de ellas por electroforesis desnaturizante (Figura 27).

mKate2	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9338_1RFP1	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9339_1RFP2	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9341_1RFP4	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9342_1RFP5	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9343_1RFP6	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9344_1RFP7	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9346_1RFP9	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9347_1RFP10	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9349_1RFP12	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9351_1RFP14	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9353_1RFP16	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9354_1RFP17	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9355_1RFP18	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9356_1RFP19	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9357_1RFP20	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT
9358_1RFP21	MSELITENMHMKLYMEGTVNNHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT

9359\_1RFP22 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9361\_1RFP24 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9458\_2RFP1 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9459\_2RFP2 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9460\_2RFP3 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9461\_2RFP4 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9462\_2RFP5 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9463\_2RFP6 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9465\_2RFP8 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9467\_2RFP10 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9468\_2RFP11 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9469\_2RFP12 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9891\_3RFP1 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9892\_3RFP2 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9893\_3RFP3 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9894\_3RFP4 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9895\_3RFP5 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9896\_3RFP6 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9897\_3RFP7 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9898\_3RFP8 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9899\_3RFP9 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9900\_3RFP10 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 9902\_3RFP12 MSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDILAT  
 \*\*\*\*\*

63 65

↓ ↓  
 mKate2 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9338\_1RFP1 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9339\_1RFP2 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9341\_1RFP4 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9342\_1RFP5 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9343\_1RFP6 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9344\_1RFP7 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9346\_1RFP9 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9347\_1RFP10 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9349\_1RFP12 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9351\_1RFP14 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9353\_1RFP16 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9354\_1RFP17 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9355\_1RFP18 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9356\_1RFP19 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9357\_1RFP20 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9358\_1RFP21 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9359\_1RFP22 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9361\_1RFP24 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9458\_2RFP1 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9459\_2RFP2 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9460\_2RFP3 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9461\_2RFP4 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9462\_2RFP5 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9463\_2RFP6 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9465\_2RFP8 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9467\_2RFP10 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9468\_2RFP11 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9469\_2RFP12 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9891\_3RFP1 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9892\_3RFP2 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9893\_3RFP3 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9894\_3RFP4 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9895\_3RFP5 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9896\_3RFP6 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9897\_3RFP7 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK



9898\_3RFP8 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9899\_3RFP9 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9900\_3RFP10 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 9902\_3RFP12 SFMYGSKTFINHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVK  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*

	121	143	158 160	180						
mKate2	↓	↓	↓ ↓	↓						
9338_1RFP1	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	ADM	ALKLVGGGHLICNLKTTYRS	MORADO
9339_1RFP2	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9341_1RFP4	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROSA MEX
9342_1RFP5	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROJA/ROSA
9343_1RFP6	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	MD	HALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9344_1RFP7	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	ADM	ALKLVGGGHLICNLKTTYRS	MORADO
9346_1RFP9	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	MD	SALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9347_1RFP10	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9349_1RFP12	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9351_1RFP14	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	GD	TALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROSA
9353_1RFP16	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	ND	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	LIGER. ROSA
9354_1RFP17	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	VALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9355_1RFP18	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	FD	HALKLVGGGHLICNLKTTYRS	LIGER. ROSA
9356_1RFP19	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	CD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROSA/ROJA
9357_1RFP20	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	VD	SALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROSA
9358_1RFP21	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	MD	SALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9359_1RFP22	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	TD	QALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROSA MEX
9361_1RFP24	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROJA/ROSA
9458_2RFP1	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9459_2RFP2	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	LD	HALKLVGGGHLICNLKTTYRS	NARANJA
9460_2RFP3	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9461_2RFP4	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9462_2RFP5	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	LD	NALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA TENUÉ
9463_2RFP6	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	CD	GALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROSA TENUÉ
9465_2RFP8	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	QALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9467_2RFP10	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	MALKLVGGGHLICNLKTTYRS	AMARILLA
9468_2RFP11	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	LD	MALKLVGGGHLICNLKTTYRS	AMAR. CAFE
9469_2RFP12	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	DD	GALKLVGGGHLICNLKTTYRS	LIGER. AMAR.
9891_3RFP1	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	ND	CALKLVGGGHLICNLKTTYRS	LIGER. ROSA
9892_3RFP2	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	CD	SALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA TENUÉ
9893_3RFP3	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	CD	QALKLVGGGHLICNLKTTYRS	AMARIL GRIS
9894_3RFP4	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	VD	MALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROSA
9895_3RFP5	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	CD	HALKLVGGGHLICNLKTTYRS	LIGER. AMAR.
9896_3RFP6	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	CD	IALKLVGGGHLICNLKTTYRS	LIGER GUINDA
9897_3RFP7	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	VD	KALKLVGGGHLICNLKTTYRS	NARANJA
9898_3RFP8	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	VD	QALKLVGGGHLICNLKTTYRS	BLANCA
9899_3RFP9	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	TD	QALKLVGGGHLICNLKTTYRS	LIGER. ROSA
9900_3RFP10	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	SD	PALKLVGGGHLICNLKTTYRS	GUINDA
9902_3RFP12	IRGVNFP	SN	GPV	MQK	TLGWEAST	EMLY	PADGGLEGR	CD	NALKLVGGGHLICNLKTTYRS	ROSA/ROJA
	***** * *****									

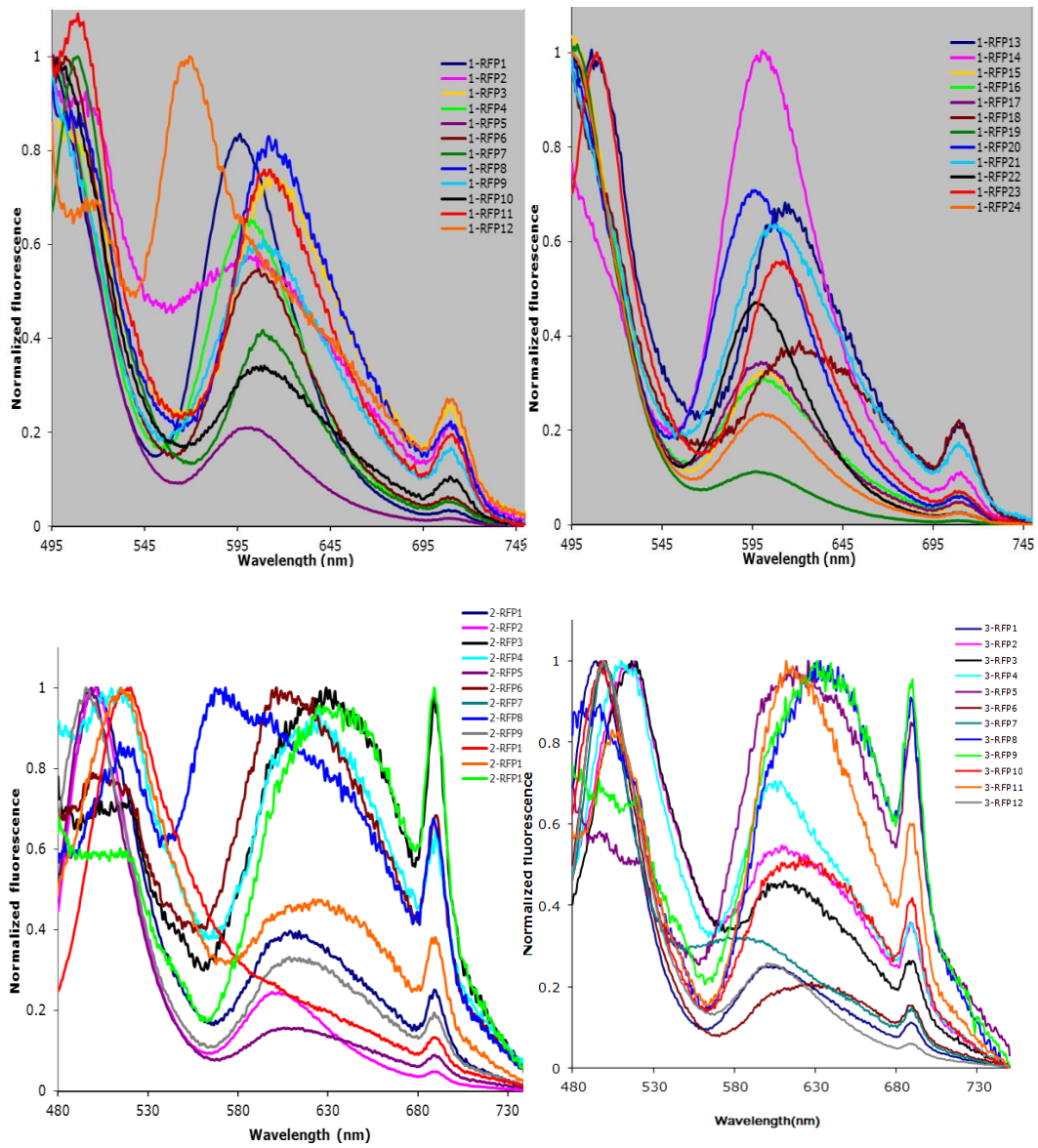
mKate2	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	-----
9338_1RFP1	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9339_1RFP2	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9341_1RFP4	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9342_1RFP5	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9343_1RFP6	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9344_1RFP7	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9346_1RFP9	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9347_1RFP10	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9349_1RFP12	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9351_1RFP14	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9353_1RFP16	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9354_1RFP17	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9355_1RFP18	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9356_1RFP19	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9357_1RFP20	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9358_1RFP21	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH
9359_1RFP22	KKPAK	NL	KMP	GV	YV	DR	RL	ER	I	KEAD	KETY	VE	Q	HE	V	A	V	A	R	Y	CD	L	P	S	K	L	G	H	K	L	N	SGGSHHHHHH

```

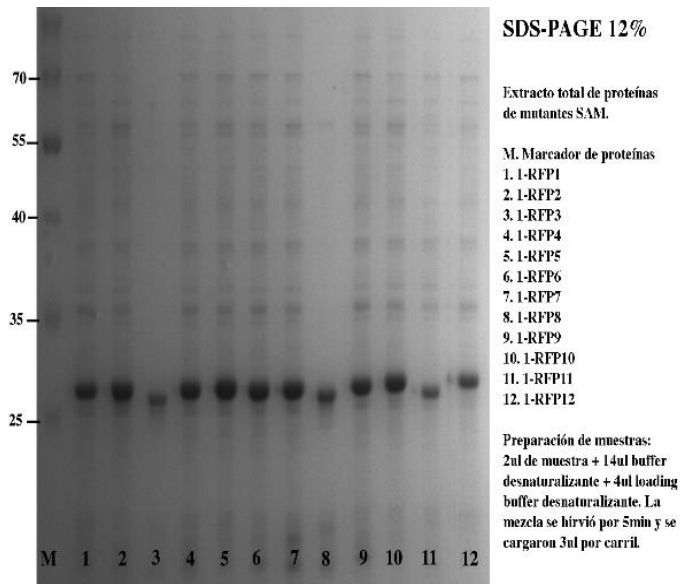
9361_1RFP24  KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9458_2RFP1   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9459_2RFP2   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9460_2RFP3   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9461_2RFP4   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9462_2RFP5   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9463_2RFP6   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9465_2RFP8   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9467_2RFP10  KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9468_2RFP11  KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9469_2RFP12  KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9891_3RFP1   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9892_3RFP2   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9893_3RFP3   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9894_3RFP4   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9895_3RFP5   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9896_3RFP6   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9897_3RFP7   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9898_3RFP8   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9899_3RFP9   KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9900_3RFP10  KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
9902_3RFP12  KKPAKNLKMPGVVYVDRRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKLNSGGSHHHHHH
*****

```

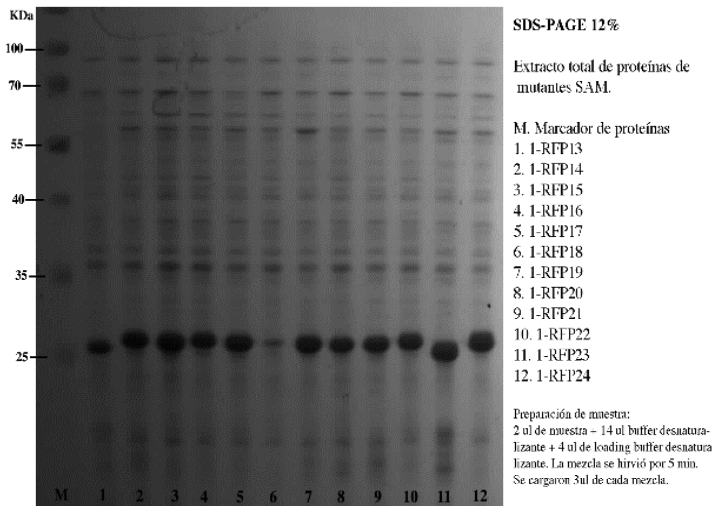
**FIGURA 25.** Secuencia primaria de aminoácidos de diversas mutantes que mostraron fenotipos interesantes durante el monitoreo visual, cuando las bacterias que las expresaron fueron irradiadas con luz azul. Cada una de las colonias analizadas fue etiquetada con una clave, indicando el número de lote y el número de muestra. Las mutaciones están resaltadas en letras negritas, mientras que el fenotipo de las colonias analizadas está indicado a la derecha de los aminoácidos 121-180. Los tres aminoácidos que dan lugar al cromóforo están resaltados en amarillo.

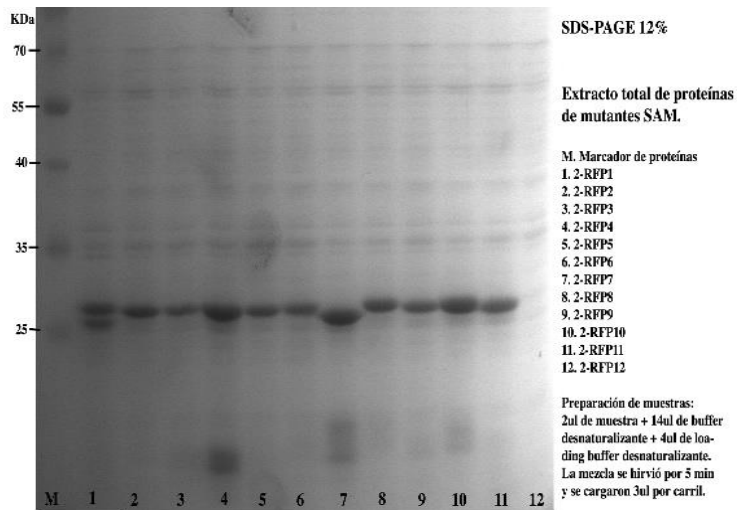


**FIGURA 26.** Espectros de emisión de las variantes fluorescentes de mKate2, excitándolas a 460 nm. Las muestras fueron seleccionadas por screening con luz azul y se analizaron en forma cruda, analizando la fracción soluble diluida en PBS.

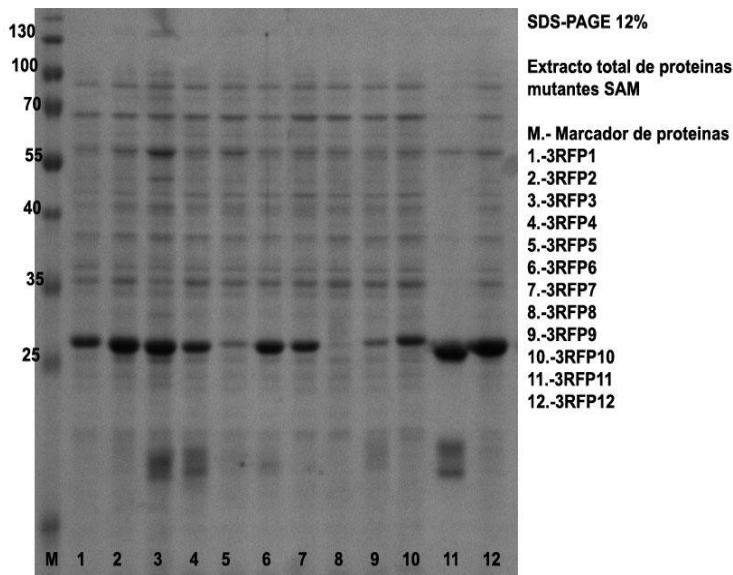


**FIGURA 27.** Análisis electroforético de las variantes fluorescentes de mKate2. Se analizó la fracción soluble en condiciones desnaturalizantes.





**Figura 27.** Análisis electroforético de las variantes fluorescentes de mKate2. Se analizó la fracción soluble en condiciones desnaturalizantes.



**Figura 27.** Análisis electroforético de las variantes fluorescentes de mKate2. Se analizó la fracción soluble en condiciones desnaturalizantes.

## 8. ANALISIS DE LOS RESULTADOS

De estos resultados podemos concluir:

1. El método de mutagénesis fue exitoso porque los tres aminoácidos seleccionados para el estudio Ser143, Ala158 y Met160 sufrieron mutaciones por diversos aminoácidos. Simplemente, en las pocas mutantes analizadas Ser143 cambió por Thr (T), Asn (N), Met (M), His (H) y Cys (C), Ala158 por Ser (S), Gly (G), Met (M), Asn (N), Phe (F), Cys (C), Val (V), Met (M), Thr (T), Leu (L) y Asp (D), Met160 por Gln (N), Asn (N) Cys (C), His (H), Ser (S), Thr (T), Val (V), His (H), Gly (G), Ile (I), Lys (K) y Pro (P). Las mutaciones faltantes probablemente no las encontramos porque el tamaño de muestra analizada fue pequeño o porque esas mutaciones afectaban el plegamiento de la proteína o la maduración del cromóforo. Para encontrar las mutaciones faltantes probablemente hubiera sido necesario secuenciar colonias con fenotipo blanco.
2. En general, la posición 143 es más restrictiva que las otras dos. En mutantes funcionales los reemplazos tolerados son preferentemente conservados, en este caso un aminoácido polar es reemplazado por otro polar como Thr (T), Asn (N), His (H) y Cys (C). La excepción fue la mutación S143M.
3. Las otras dos posiciones 158 y 160 son más tolerantes y aceptan reemplazos de cualquier tipo de aminoácido, a pesar de que las cadenas laterales están dirigidas hacia el interior del barril donde prevalece un ambiente hidrofóbico.
4. Según el análisis electroforético de la fracción soluble de extractos crudos, casi todas las variantes proteicas fueron muy solubles, encontrándose en niveles similares a la proteína parental mKate2 representada por la variante 1RPF7. La excepción fueron las mutantes 1RFP18, 3RFP5, 3RFP8, 3RFP9 y 3RFP10, en las cuales probablemente alguna de sus mutaciones afectó la velocidad de plegamiento de la proteína, impactando su producción final.
5. Algunas variantes como 1RFP23, 2RFP4, 2RFP7, 3RFP3, 3RFP4 y 3RFP11 produjeron una proporción importante de bandas proteicas de menor peso molecular que la proteína completa. Estas bandas corresponden a productos hidrolizados durante el proceso de plegamiento de la proteína, una ruta alterna a la maduración del cromóforo.[55, 56]
6. Al analizar los espectros de emisión de todas las variantes, excitándolas a 460 nm, se observó que muchas de ellas continuaron presentando una alta proporción del pico de emisión verde, incluso más que la proteína parental mKate2. Ejemplo de ello fueron las mutantes 1RFP16, 1RFP17, 1RFP19, 1RFP24, 2RFP5, 2RFP9, 3RFP6, 3RFP9 y 3RFP12. Esto significa que en estas mutantes la maduración del cromóforo rojo fue menos eficiente.
7. Otras tantas mutantes como 1RFP4, 1RFP6, 1RFP10 y 2RFP1 mostraron una proporción similar a mKate2, representada por la variante 1RFP7.

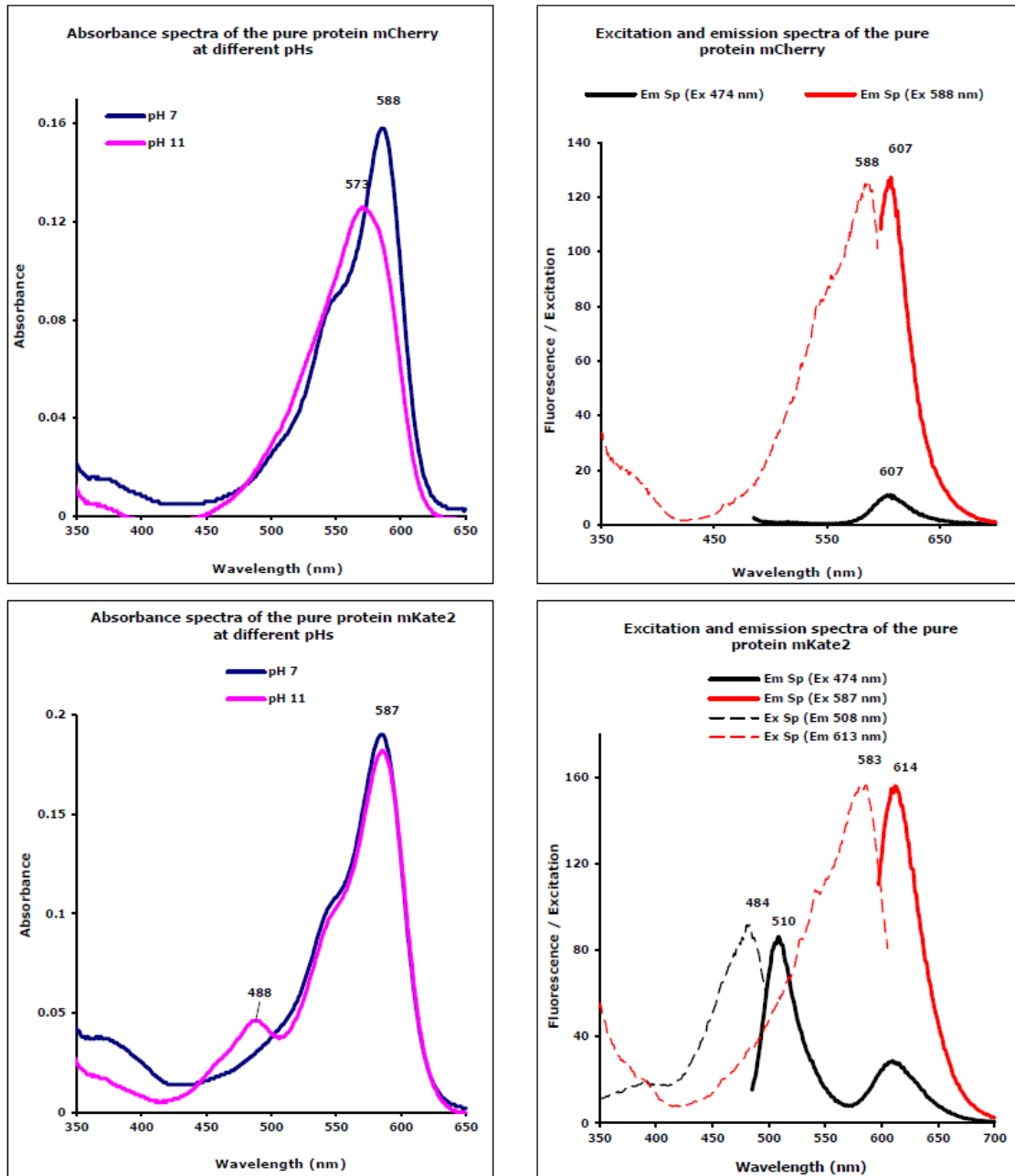
8. Otras mutantes más presentaron una proporción similar del pico verde y del pico rojo, revelando una mejor maduración del cromóforo rojo. Tal fue el caso de las variantes 1RFP1, 1RFP14 y 2RFP4.
9. Otras mutantes como 1RFP12, 2RFP3, 2RFP6, 2RFP12, 3RFP5 y 3RFP9 mostraron una menor proporción del pico verde con respecto al rojo indicando una conversión más eficiente del cromóforo rojo.

Tras estos resultados, decidimos continuar trabajando solo con las proteínas 1RFP1 (mKate2-M160Q), 1RFP2, 1RFP4, 1RFP12, 1RFP18, 1RFP22, 2RFP2, 2RFP3, 2RFP6, 2RFP10, 2RFP11, 2RFP12, 3RFP3, 3RFP5, 3RFP7, 3RFP9 y 3RFP12 ya sea porque presentaron una menor proporción del pico verde, por sus fenotipos interesantes o por el tipo de mutaciones que presentaron a nivel de aminoácidos. Para una caracterización más detallada de cada una de estas proteínas mutantes, decidimos purificarlas por cromatografía de afinidad a níquel usando un HPLC para el proceso de elución. Todas nuestras proteínas heterólogas son afines a níquel porque presentan una etiqueta de 6 histidinas contiguas al final de la secuencia, capaz de formar complejos con dicho metal. El níquel se encuentra unido a la fase estacionaria. La mayoría de proteínas purificadas fueron muy coloridas y fluorescentes cuando se excitaron con luz azul, como se observa en la Figura 28, suponiendo una importante proporción del cromóforo verde en la proteína purificada. Sin embargo, algunas de ellas como 1RFP2, 1RFP12, 2RFP3, 2RFP11 y 3RFP3 también fueron muy coloridas a simple vista, pero en cambio, fueron poco fluorescentes cuando se excitaron con luz azul, intuyendo una baja proporción del cromóforo verde. Otras tres proteínas 2RFP10, 2RFP12 y 3RFP5 también resultaron poco fluorescentes, aunque no fueron rojas como la proteína parental, o verde oscuras como la cromoproteína de referencia mKate-S143C. Para tratar de entender estos fenotipos, a cada proteína se le determinó su espectro de absorbancia en dos condiciones de pH (7 y 11) para conocer el estado iónico de los cromóforos presentes, así como su espectro de excitación / emisión a pH 7, excitando las proteínas a la longitud de onda óptima de excitación de GFP (474 nm) y a la longitud de onda máxima obtenida en el espectro de absorción (Figura 29).



**FIGURA 28.** Proteínas purificadas por HPLC, fotografiadas con luz natural (primer y tercer panel) y con luz azul / filtro anaranjado (segundo y cuarto panel). Los aminoácidos indicados abajo del nombre de cada proteína corresponden a las mutaciones S143X, A158X y M160X con respecto a la proteína parental mKate2, mismas que adquirieron durante el proceso de mutagénesis.





**FIGURA 29.** Espectros de absorción, excitación y emisión de algunas variantes de mKate2 purificadas por HPLC, junto con las proteínas de referencia mCherry, mKate2 y la mutante mKate2-M160Q (1RPF1).

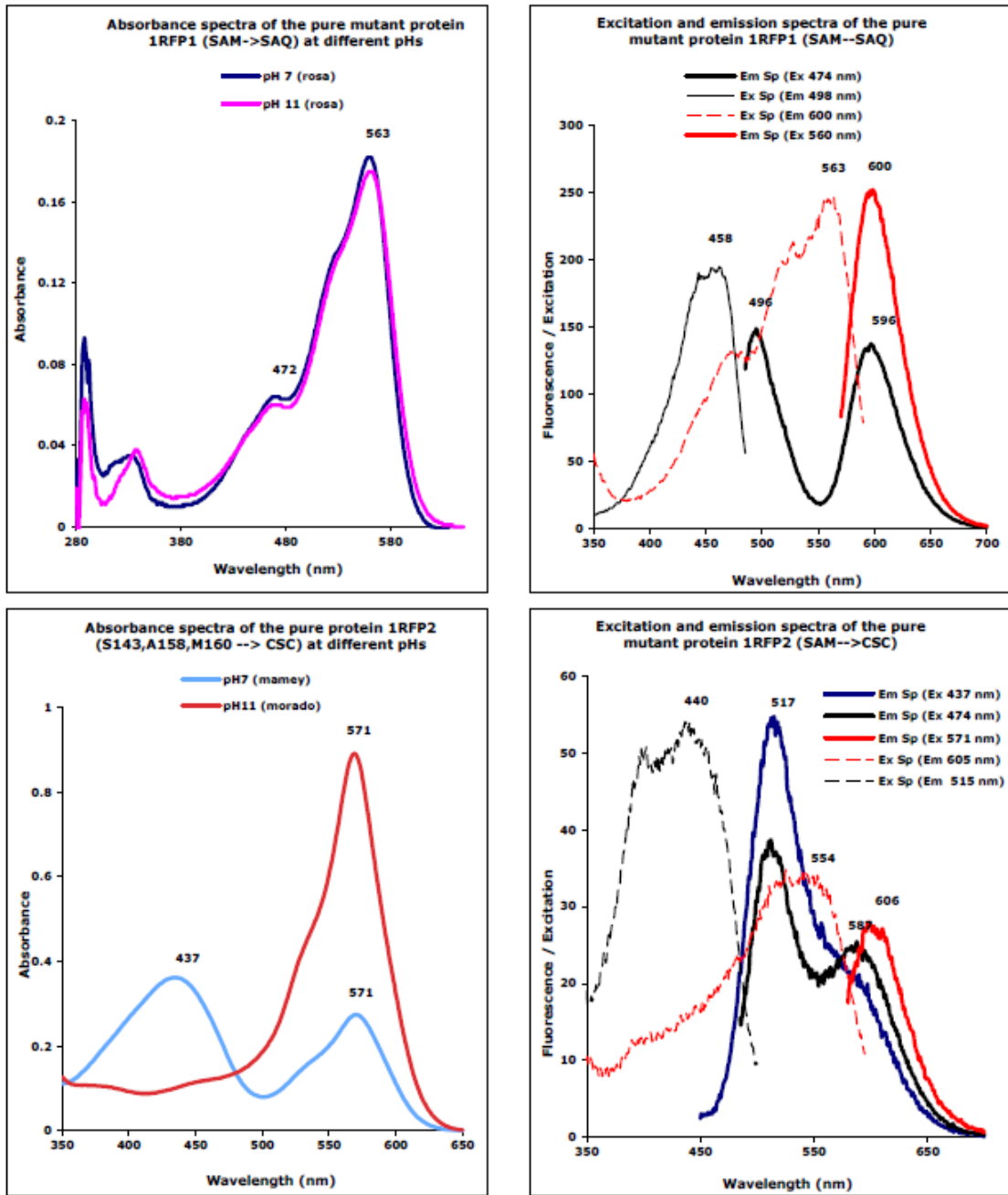


Figura 29. Continuación...

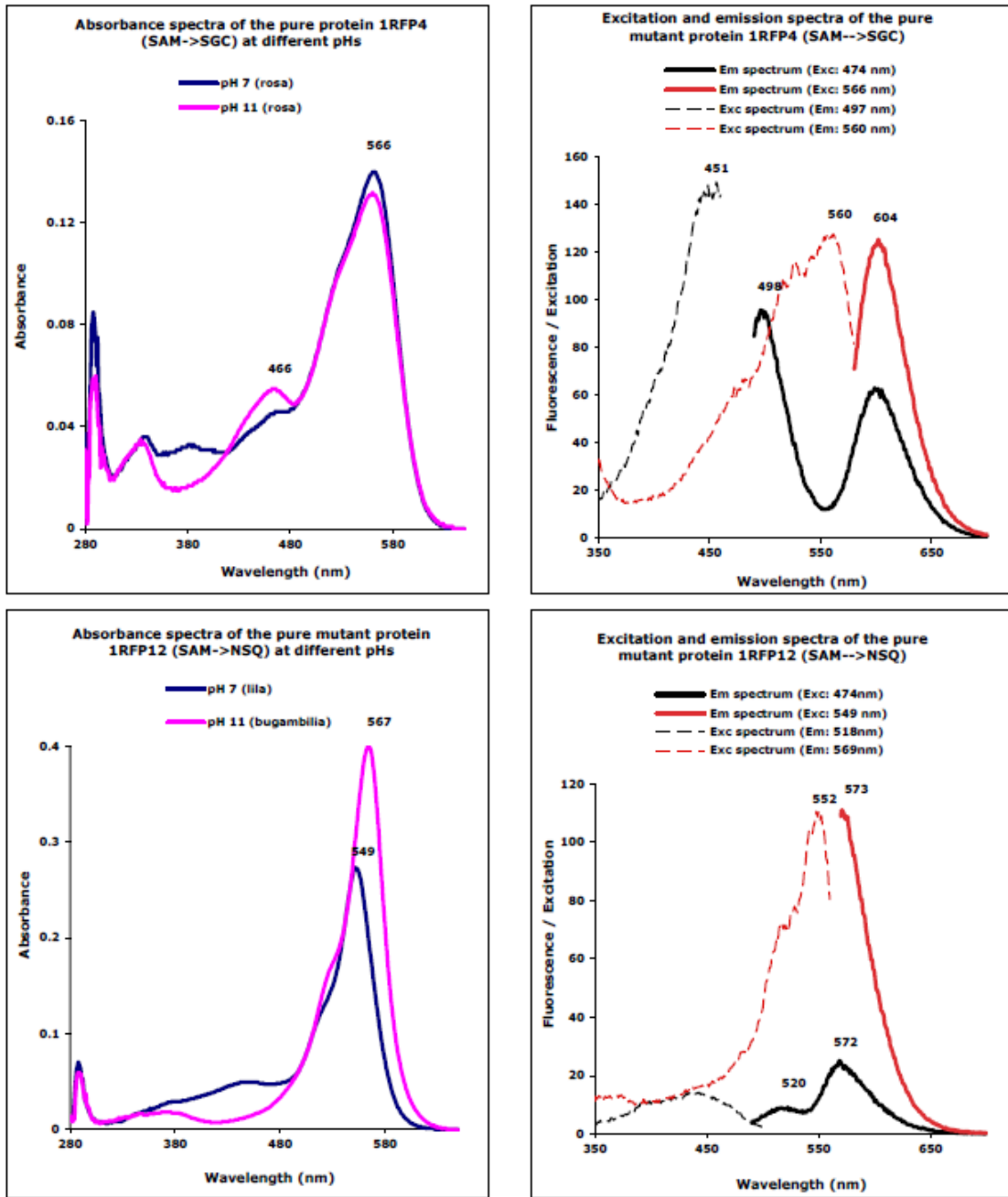


Figura 29. Continuación...

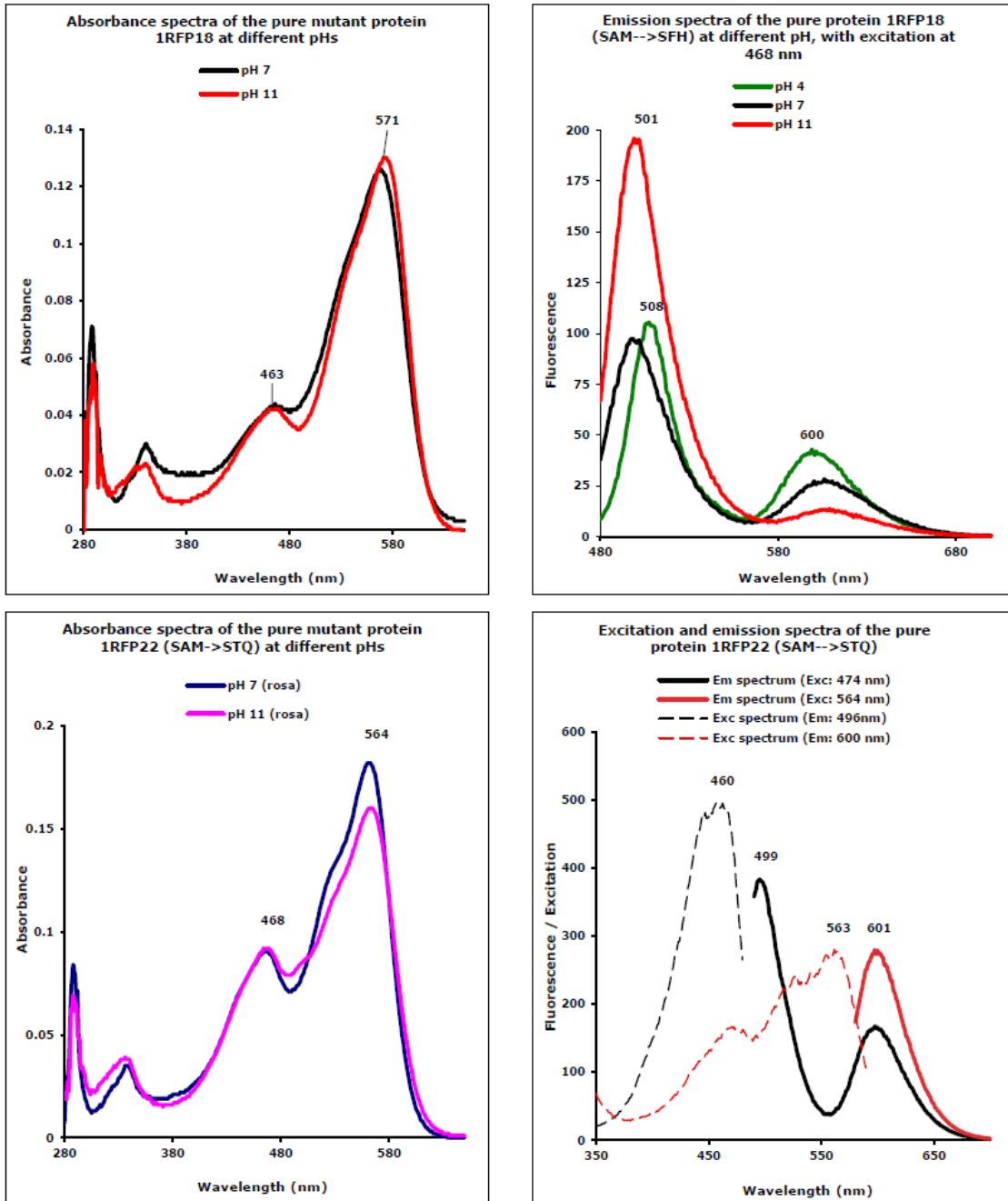


Figura 29. Continuación...

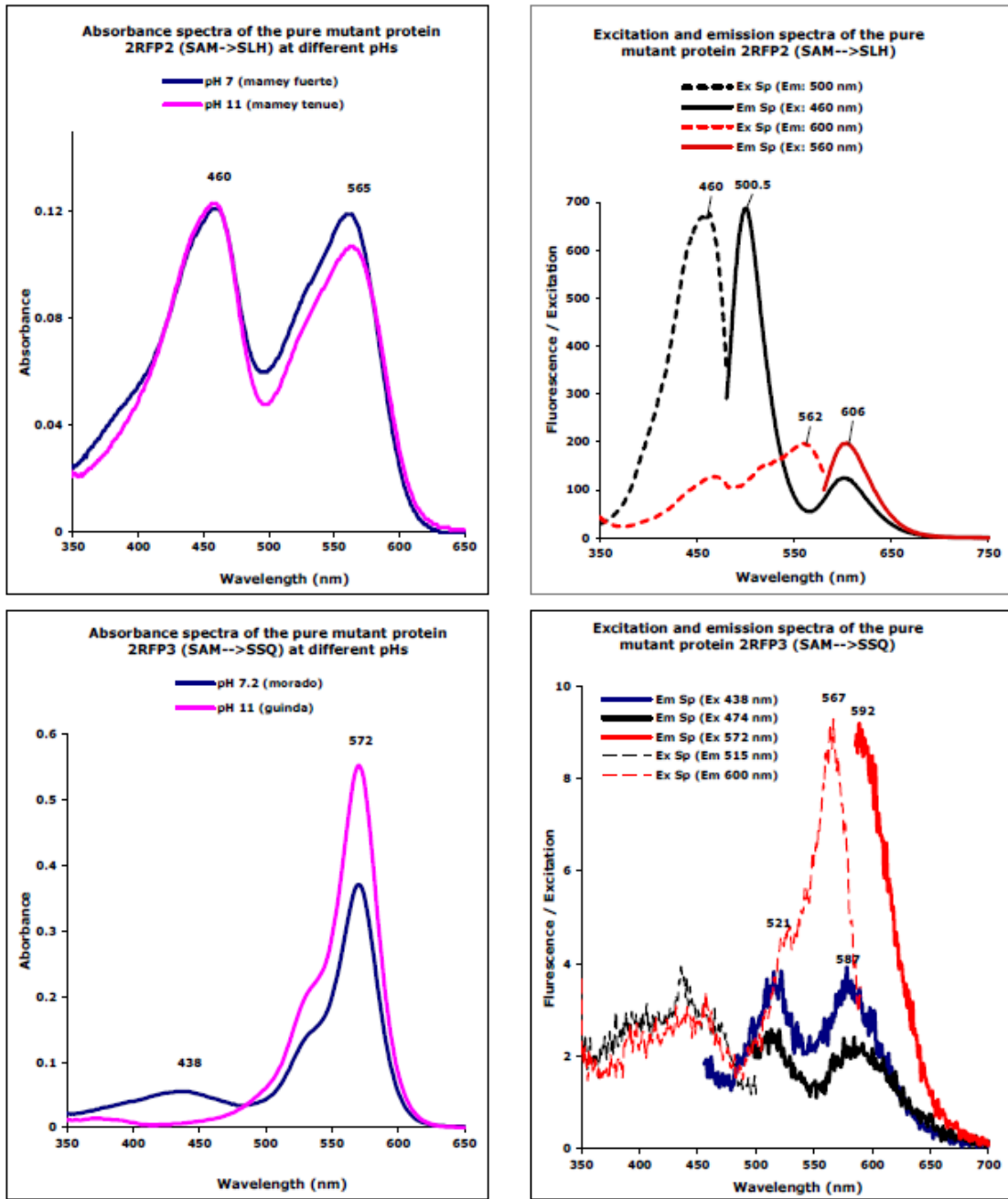


Figura 29. Continuación...

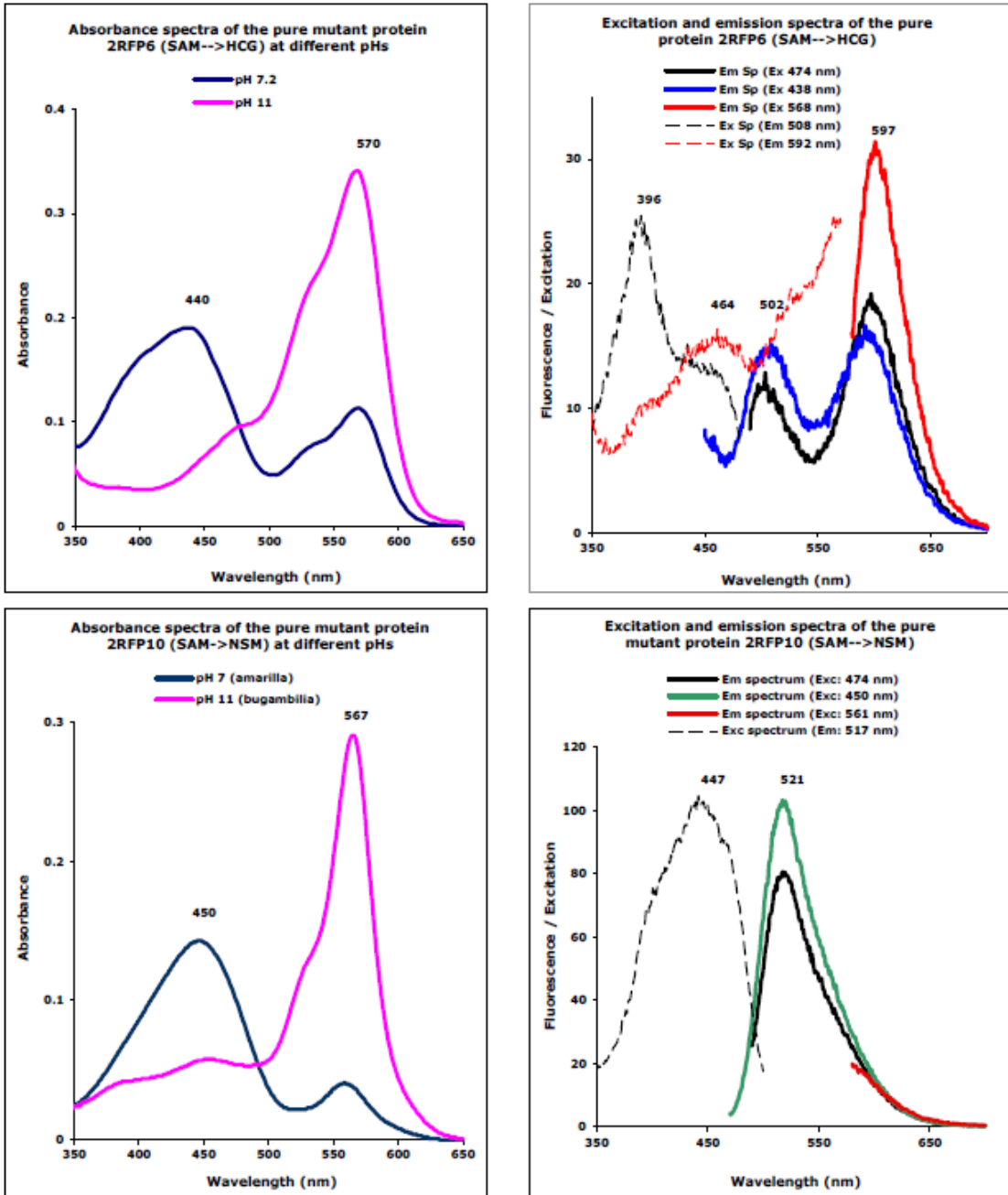


Figura 29. Continuación...

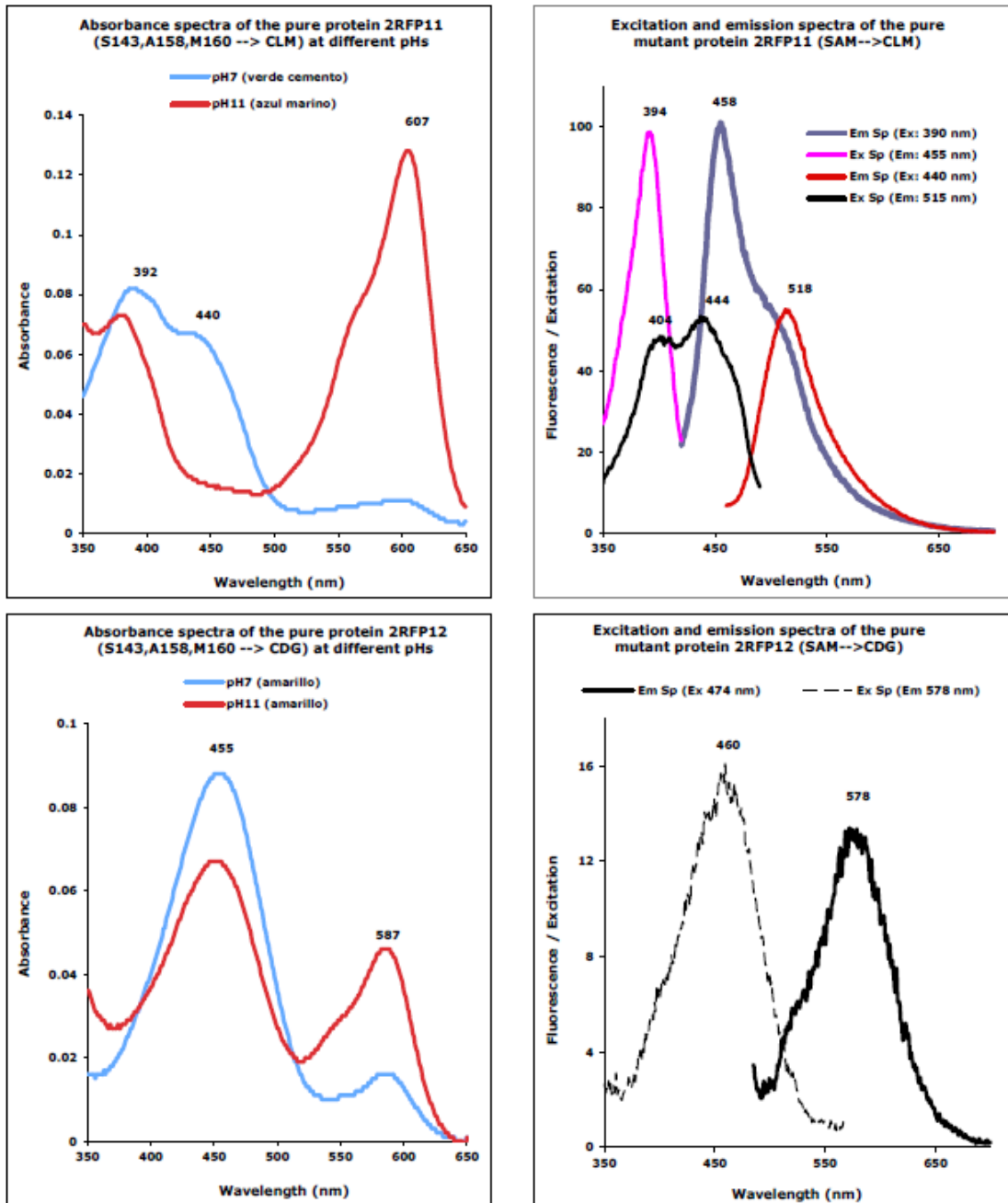


Figura 29. Continuación...

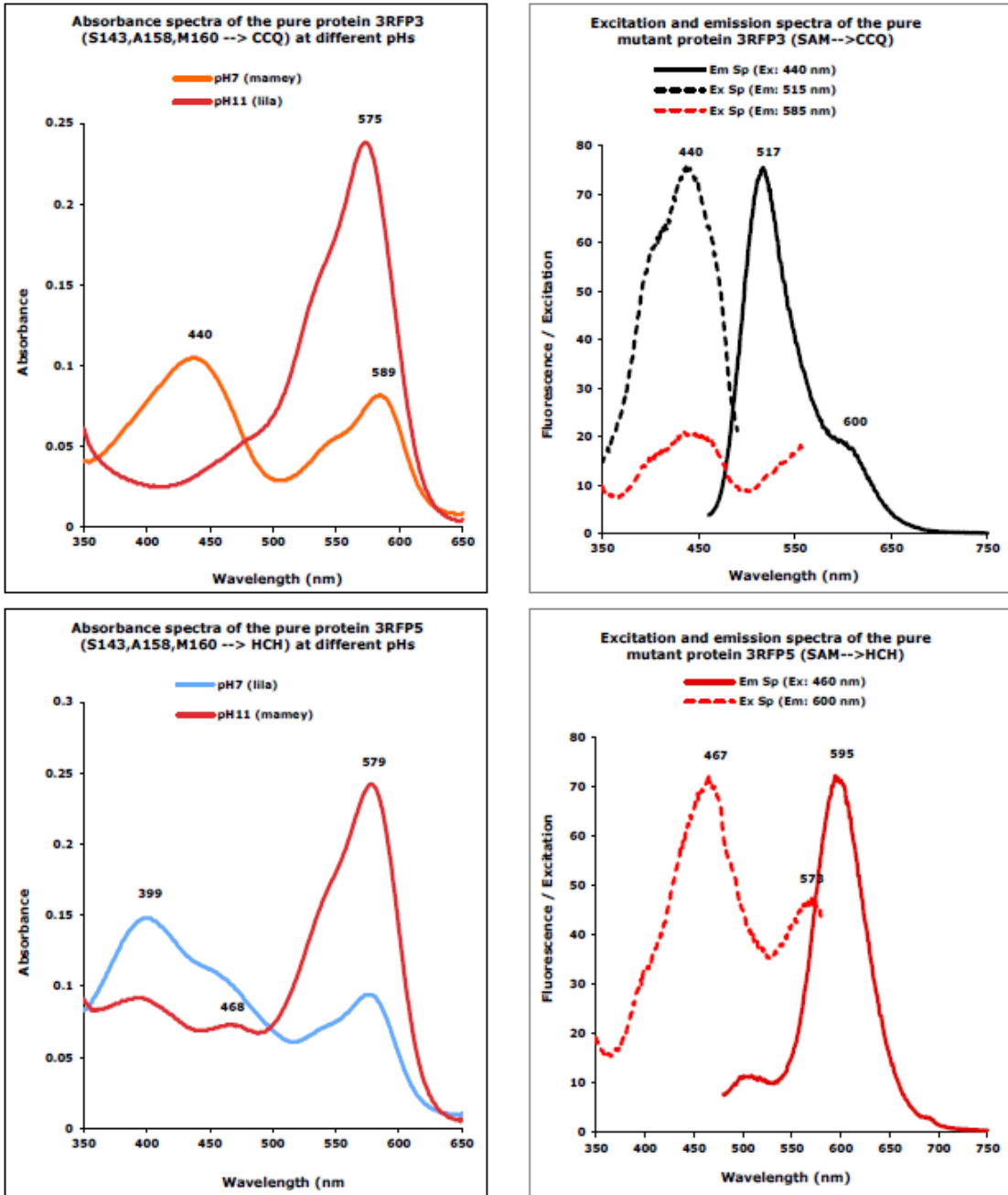


Figura 29. Continuación...



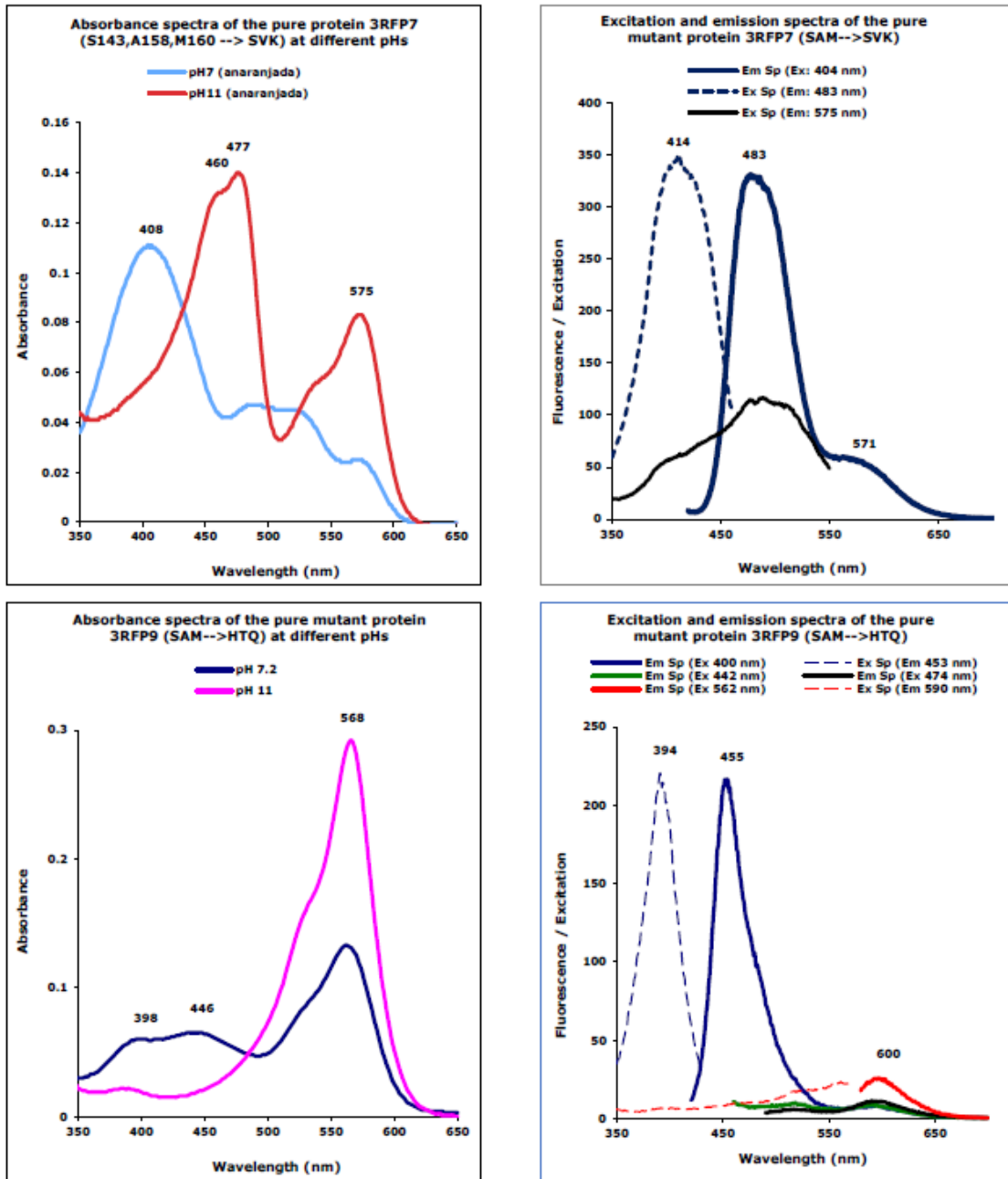
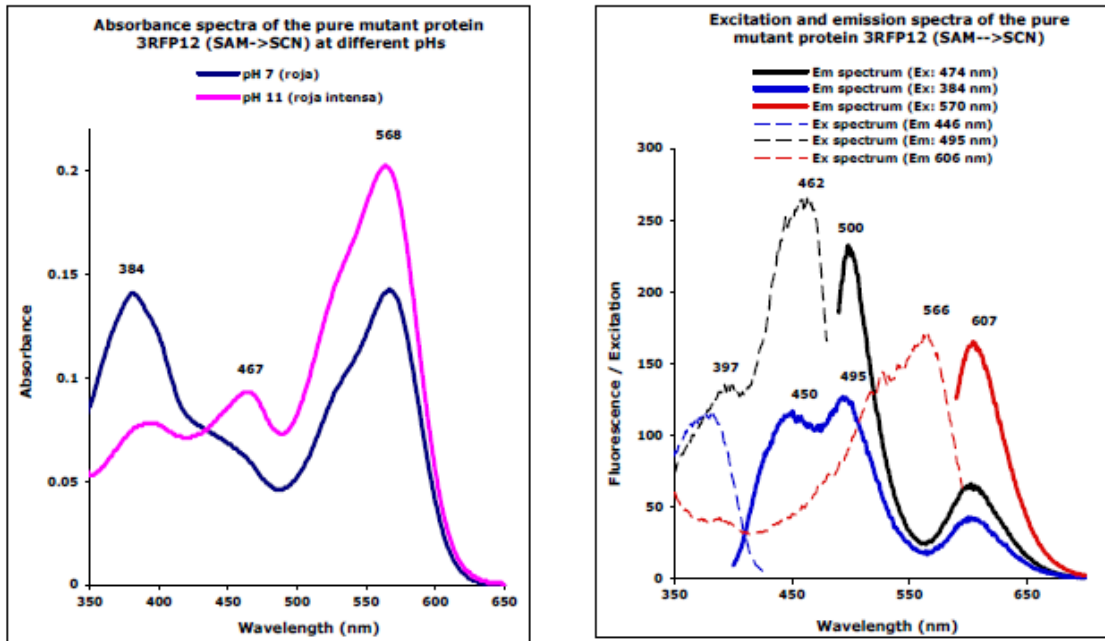


Figura 29. Continuación...



**Figura 29.** Continuación...

Al analizar los espectros de absorción notamos que muchas de las variantes proteicas presentaban más de un pico de absorción, que podían ser 2, 3 o 4. Idealmente debería existir un solo pico de absorción si la proteína roja logra madurarse completamente y se encuentra en un solo estado iónico como en el caso de la proteína mCherry. De las variantes analizadas, sólo dos cumplieron con esta característica: 1RFP12 y 2RFP3. La presencia de dos picos que se transforman en uno solo de mayor longitud de onda cuando se incrementa el pH, como en el caso de las variantes 1RFP2, 2RFP6, 2RPF10 y 3RFP3, significa que en estos casos la maduración de la proteína roja también se completó, pero el cromóforo rojo se encuentra en equilibrio entre el estado protonado o neutro correspondiente al pico de menor longitud de onda, y el estado iónico correspondiente al pico de mayor longitud de onda. Sin embargo, la presencia de dos picos cuya proporción no cambia al incrementar el pH, como en el caso de 2RFP2, significa que existe una alta proporción del intermediario tipo GFP con absorción máxima centrada en 460 nm, pero también una alta proporción del cromóforo rojo cuya absorción está centrada en 565 nm. Ambos cromóforos se encuentran en estado iónico y por eso son insensibles al aumento de pH. Por tanto, la maduración de la proteína 2RFP2 fue mucho menos eficiente que la proteína parental mKate2. La ausencia de picos tipo GFP en las variantes 1RFP2, 2RFP6, 2RPF10 y 3RFP3 significa que los genes de estas proteínas podrían servir de templado para continuar el proceso de evolución *in vitro* con el objetivo de producir una proteína derivada de mKate2, estrictamente roja cuyo cromóforo se encuentre totalmente ionizado a pH neutro, en forma similar a la generación de la proteína EGFP

(enhanced GFP) a partir de la proteína original GFP que también presentaba dos picos de absorción.[18]

Por otra parte, el cambio de pH de proteínas cuyo cromóforo se encuentra en equilibrio entre el estado neutro y el estado iónico, algunas veces conlleva un cambio de coloración de la proteína. Por ejemplo, a pH 7 1RFP2 es color anaranjado oscuro pero a pH 11 es morada. 2RFP10 cambia de amarillo a morada. Esto significa que éste tipo de proteínas podrían funcionar como indicadores de pH a nivel intracelular, analizando el cambio de coloración por microscopía confocal.[57]

En la ruta de maduración del cromóforo tipo RFP se han propuesto dos intermediarios: el cromóforo verde tipo GFP y el cromóforo azul tipo mTagBFP (Figura 6). La existencia de 3 o 4 picos en el espectro de absorción significa que tanto el intermediario como el producto final se encuentran presentes en la solución proteica final, pero pueden estar en estado neutro, en estado iónico o en ambos estados.[58]

Claramente, el intermediario azul mTagBFP se encuentra presente en las mutantes 2RFP11 (S143C y A158L) y 3RFP9 (S143H, A158T y M160Q), con picos de absorción centrados en 392 y 398 nm respectivamente. Aunque estos picos no son los más abundantes en ambos espectros de absorción, cuando la proteína se excita a las diferentes longitudes de onda máxima encontradas en cada espectro, el pico de emisión más intenso es el correspondiente al cromóforo tipo mTagBFP centrado a aproximadamente 455 nm, correlacionando con los máximos de excitación y emisión reportados para la proteína pura mTagBFP, centrados en 399 y 456 nm respectivamente.

Al analizar los espectros de excitación / emisión de las proteínas 1RFP12 y 2RFP3 notamos que sólo 1RFP12 era fluorescente, presentando un pico de excitación centrado en 552 nm y un pico de emisión en 573 nm. 2RFP3 a pesar de ser muy colorida dio una señal de emisión muy baja cuando se excitó a su longitud de onda máxima de absorción (567 nm). Por tanto, 2RFP3, al igual que las proteínas 1RFP2 y 2RFP6 podrían ser clasificadas como cromoproteínas: proteínas muy coloridas pero no fluorescentes que pueden ser usadas como apagadores de fluorescencia en experimentos FRET. 1RFP2 contiene las mutaciones serina 143 por cisteína (S143C), alanina 158 por serina (A158S) y metionina 160 por cisteína (M160C), mientras que 2RFP3 contiene solo dos mutaciones: alanina 158 por serina (A158S) y metionina 160 por glutamina (M160Q). 2RFP6 contiene las mutaciones serina 143 por histidina (S143H), alanina 158 por cisteína (A158C) y metionina 160 por glicina (M160G). Probablemente, las mutaciones adquiridas en estas variantes favorecieron la formación del isómero *trans* durante el proceso de oxidación del cromóforo, debido a la presencia de un residuo polar en la posición 158, capaz de formar puentes de hidrógeno con el fenolato de la tirosina 66 localizada en el centro del cromóforo. Como se mencionó anteriormente, residuos polares en la posición 140 favorecen la conformación fluorescente *cis*, mientras que residuos polares en la posición 158 favorecen la conformación *trans* no

fluorescente, destruyendo la coplanaridad entre el anillo fenólico de Tyr66 y el anillo de imidazolinona generado en los primeros dos pasos de formación del cromóforo, evitando una resonancia electrónica efectiva entre ambos anillos aromáticos y en consecuencia el fenómeno de fluorescencia.

Al excitar a 460 nm todas las proteínas purificadas (longitud de onda de excitación cercana al máximo de EGFP), confirmamos que la mutante 1RFP12 era la única variante que presentaba un pico de emisión verde muy disminuido y un pico principal de emisión roja centrado en 570 nm. Esta mutante presentó las mutaciones serina 143 por asparagina (S143N), alanina 158 por serina (A158S) y metionina 160 por glutamina (M160Q). Debido a que esta variante es una triple mutante con respecto a la proteína parental mKate2, nos preguntamos cual de las tres mutaciones fue la determinante del cambio de fenotipo y mejoramiento de maduración del cromóforo tipo RFP. A través de la mutante mKate-M160Q, la cual contiene solo la mutación M160Q, confirmamos que dicha mutación reducía el pico de emisión verde al mismo nivel que el pico de emisión roja cuando la proteína se excitaba a 460 nm, pero no lo desaparecía. Por tanto, la mutación M160Q es un importante contribuyente al mejoramiento de maduración en la mutante 1RFP1 y también en la mutante 1RFP12, como lo confirmó la mutante 2RFP10. Esta mutante amarilla contiene la reversión Q160M con respecto a 1RFP12 y su espectro de absorción a pH 7 contiene un pico máximo centrado en 450 nm y un pico de menor intensidad centrado en 567 nm; ambos se transforman en un solo pico de 567 nm cuando el pH se incrementa a 11. Por tanto, en el escenario de 1RFP12 Q160 es importante para lograr la ionización completa del cromóforo a pH neutro. Sin embargo, al excitar ambas proteínas a 460 nm, en el caso de 1RFP12 se observa claramente la separación de los dos picos de emisión correspondientes al cromóforo verde (intermediario GFP) y al cromóforo rojo (producto final), pero en el caso de 2RFP10 sólo se observa un pico de emisión ensanchado, centrado en 521 nm, que no corresponde al intermediario tipo GFP, sino más bien a un pico amarillo. Por tanto, parece que el cromóforo protonado tipo RFP en 2RFP10, no es capaz de sufrir el proceso de ESPT y por ello emite luz a una longitud de onda más corta que su contraparte ionizada, como sucede en muchas variantes de GFP cuyo cromóforo protonado produce luz azul en vez de luz verde.

Por último, la única diferencia a nivel de estructura primaria entre la proteína fluorescente 1RFP12 y la cromoproteína 2RFP3 es el aminoácido localizado en la posición 143: asparagina en la primera y serina en la segunda. Ambas proteínas presentan espectros de absorción muy parecidos, con picos que corresponden a cromóforos ionizados tanto a pH 7 como a pH 11. Sin embargo, sus espectros de fluorescencia son muy distintos: 2RFP3 es poco fluorescente y cuando la proteína se excita a 474 nm, se observa que el intermediario tipo GFP emite una señal de intensidad similar al cromóforo rojo. Por tanto, asparagina en la posición 143 en 1RFP12 también parece ser importante para el fenotipo de la proteína, ayudando a lograr una maduración más eficiente del cromóforo rojo, permitiendo adoptar

una conformación que lo hace mas fluorescente. Sin embargo, para conocer la conformación exacta de los cromóforos tanto de 1RFP12 como de 2RFP3 será necesario cristalizar ambas proteínas y elucidar su estructura tridimensional.

Finalmente, para elucidar el papel de serina 158 (S158) en 1RFP12 será necesario construir la mutante 1RFP12-S158A para analizar sus características fluorescentes, aunque lo mas probable es que dicha proteína sea fluorescente porque la cadena lateral de alanina es un grupo metilo que no puede formar puentes de hidrógeno con el hidroxilo fenólico del cromóforo y por tanto no puede estabilizar la conformación *trans* que daría lugar al cromóforo no fluorescente.

### **Propiedades fluorescentes de 1RFP12**

La brillantez de una molécula está determinada por dos propiedades ópticas: el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) y el rendimiento cuántico ( $\phi$ ). El coeficiente de extinción molar se define como la fuerza con que una sustancia absorbe luz a una determinada longitud de onda, mientras que el rendimiento cuántico se define como la proporción entre el número de protones emitidos y el número de protones absorbidos por una sustancia fluorescente. La brillantez se obtiene multiplicando el coeficiente de extinción molar por el rendimiento cuántico y dividiendo entre 1000. Aquí es importante mencionar que muchos compuestos son coloridos (cromogénicos) porque absorben luz en la región visible del espectro electromagnético, pero no son fluorescentes porque no son capaces de estabilizar los electrones en los estados excitados como lo hacen los compuestos que si son fluorescentes.

Tras determinar las propiedades fluorescentes de 1RFP12, la mutante sencilla mKate2-M160Q y la proteína parental mKate2, resumidas en la Tabla 3, encontramos que 1RFP12 fue la mutante mas colorida, presentando el mayor coeficiente de extinción, pero también fue la menos fluorescente mostrando el menor rendimiento cuántico y por tanto fue la variante menos brillante. En cambio, la mutante mKate2-M160Q fue la variante menos colorida pero fue la mas fluorescente y mas brillante.

Por tanto, aunque logramos el objetivo de eliminar el pico de emisión verde presente en la proteína parental e intermediario en la formación del cromóforo rojo final, definitivamente la proteína 1RFP12 se volvió menos fluorescente y ahora restaría recuperarle esta propiedad a través de un proceso de evolución dirigida, labor que quedará pendiente para un trabajo futuro.

**TABLA 3** . Propiedades ópticas de las mutantes 1RFP1 y 1RFP12 comparadas con la proteína parental mKate2.

Proteína	Mutaciones	A <sub>max</sub> (nm)	E <sub>Xmax</sub> (nm)	E <sub>mmax</sub> (nm)	EC (ε) (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	QY (φ)	Brillantez (EC*QY/1000)	Em <sup>RFP</sup> /Em <sup>GFP</sup>
mKate2	SAM	587	587	615	42087	0.40	16.83	0.33
1RFP1	SAQ	563	563	600	32700	0.58	18.96	0.91
1RFP12	NSQ	549	552	573	44,653 ± 1,615	0.14	6.25	2.86

## CONCLUSIONES

1. La mutación sitio-dirigida M160Q en la proteína mKate2 incrementó la eficiencia de maduración de la proteína, al observarse una menor proporción del pico de emisión del intermediario GFP, con respecto al pico de emisión del cromóforo rojo final. Tendríamos que conocer el mecanismo exacto de maduración para saber cómo operó este mejoramiento.
2. Los aminoácidos serina 143, alanina 158 y metionina 160, localizados en la periferia de la proteína interactúan directamente con el cromóforo. Por esta razón muchas mutaciones en ellos generaron cambios en sus propiedades físicas.
3. La mutante 1RFP12, conteniendo las mutaciones S143N, A158S y M160Q, presentó la menor proporción del intermediario verde con respecto al producto final rojo. En esta mutante Q160 fue importante para lograr una mejor maduración, pero N143 fue importante para obtener una ionización completa del cromóforo rojo. Aún resta determinar el efecto de la mutación A158S.
4. Se obtuvieron mutantes con propiedades interesantes adicionales. Por ejemplo, cromoproteínas no fluorescentes (2RFP3, 1RFP2, 2RFP6) y proteínas con distancias grandes entre la longitud de onda de excitación y emisión (LSS por sus siglas en inglés; 2RFP12 y 3RFP5), las cuales pueden tener aplicación en experimentos FRET y multimarcaje.
5. Por último, queda por estudiar la proteína 3RFP7, proteína que presenta un fenotipo anaranjado intenso y cuyo espectro de emisión con un pico máximo centrado en 483 nm indicaría que la proteína debería ser azul cian y no aranjada.

## 9. BIBLIOGRAFIA

1. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 509-44.
2. Olenych, S.G., et al., *The fluorescent protein color palette*. Curr Protoc Cell Biol, 2007. **Chapter 21**: p. Unit 21 5.
3. Heim, R. and R.Y. Tsien, *Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer*. Curr Biol, 1996. **6**(2): p. 178-82.
4. Hastings, J.W. and J.G. Morin, *Calcium-Triggered Light Emission in Renilla . A Unitary Biochemical Scheme for Coelenterate Bioluminescence*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1969. **37**(3): p. 493-+.
5. Hastings, J.W. and J.G. Morin, *Comparative Biochemistry of Calcium-Activated Photoproteins from Ctenophore, Mnemiopsis and Coelenterates Aequorea, Obelia, Pelagia and Renilla*. Biological Bulletin, 1969. **137**(2): p. 402-&.
6. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(10): p. 1246-51.
7. Shimomura, O., *Structure of the Chromophore of Aequorea Green Fluorescent Protein*. Febs Letters, 1979. **104**(2): p. 220-222.
8. Ai, H.W., et al., *Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins*. Biochemistry, 2007. **46**(20): p. 5904-10.
9. Hutchison, C.A., 3rd, et al., *A complete library of point substitution mutations in the glucocorticoid response element of mouse mammary tumor virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(3): p. 710-4.
10. Binkowski, B.F., et al., *Correcting errors in synthetic DNA through consensus shuffling*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(6): p. e55.
11. Cubitt, A.B., et al., *Understanding, Improving and Using Green Fluorescent Proteins*. Trends in Biochemical Sciences, 1995. **20**(11): p. 448-455.
12. Wachter, R.M., *Chromogenic cross-link formation in green fluorescent protein*. Acc Chem Res, 2007. **40**(2): p. 120-7.
13. Lemay, N.P., et al., *The role of the tight-turn, broken hydrogen bonding, Glu222 and Arg96 in the post-translational green fluorescent protein chromophore formation*. Chemical Physics, 2008. **348**(1-3): p. 152-160.
14. Branchini, B.R., A.R. Nemser, and M. Zimmer, *A computational analysis of the unique protein-induced tight turn that results in posttranslational chromophore formation in green fluorescent protein*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(1): p. 1-6.
15. Barondeau, D.P., et al., *Understanding GFP posttranslational chemistry: structures of designed variants that achieve backbone fragmentation, hydrolysis, and decarboxylation*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(14): p. 4685-93.
16. Iizuka, R., M. Yamagishi-Shirasaki, and T. Funatsu, *Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins*. Anal Biochem, 2011. **414**(2): p. 173-8.
17. Heim, R., D.C. Prasher, and R.Y. Tsien, *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12501-4.
18. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.
19. Pedelacq, J.D., et al., *Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(1): p. 79-88.

20. Matz, M.V., *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species (vol 17, pg 969, 1999)*. Nature Biotechnology, 1999. **17**(12): p. 1227-1227.
21. Matz, M.V., et al., *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 969-73.
22. Gross, L.A., et al., *The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 11990-5.
23. Shen, Y., T. Lai, and R.E. Campbell, *Red fluorescent proteins (RFPs) and RFP-based biosensors for neuronal imaging applications*. Neurophotonics, 2015. **2**(3): p. 031203.
24. Subach, O.M., et al., *Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins*. Chem Biol, 2010. **17**(4): p. 333-41.
25. Baird, G.S., D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien, *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 11984-9.
26. Neylon, C., *Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(4): p. 1448-59.
27. Lutz, S. and W.M. Patrick, *Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity*. Curr Opin Biotechnol, 2004. **15**(4): p. 291-7.
28. Campbell, R.E., et al., *A monomeric red fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 7877-82.
29. Shu, X., et al., *Novel chromophores and buried charges control color in mFruits*. Biochemistry, 2006. **45**(32): p. 9639-47.
30. Shaner, N.C., *The mFruit collection of monomeric fluorescent proteins*. Clin Chem, 2013. **59**(2): p. 440-1.
31. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 1567-72.
32. Shaner, N.C., et al., *Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins*. Nature Methods, 2008. **5**(6): p. 545-551.
33. Gurskaya, N.G., et al., *GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins*. FEBS Lett, 2001. **507**(1): p. 16-20.
34. Gurskaya, N.G., et al., *Color transitions in coral's fluorescent proteins by site-directed mutagenesis*. BMC Biochem, 2001. **2**: p. 6.
35. Costantini, L.M., et al., *A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments*. Nature Communications, 2015. **6**.
36. Shcherbakova, D.M., M. Baloban, and V.V. Verkhusha, *A palette of near-infrared fluorescent proteins*. Molecular Biology of the Cell, 2014. **25**.
37. Wang, L. and R.Y. Tsien, *Evolving proteins in mammalian cells using somatic hypermutation*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1346-50.
38. Wang, L., et al., *Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(48): p. 16745-9.
39. Shkrob, M.A., et al., *Far-red fluorescent proteins evolved from a blue chromoprotein from Actinia equina*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 3): p. 649-54.
40. Shcherbo, D., et al., *Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging*. Nat Methods, 2007. **4**(9): p. 741-6.



41. Pletnev, S., et al., *A crystallographic study of bright far-red fluorescent protein mKate reveals pH-induced cis-trans isomerization of the chromophore*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 28980-7.
42. Shcherbo, D., et al., *Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues*. Biochem J, 2009. **418**(3): p. 567-74.
43. Johnson, M.S., et al., *Knowledge-Based Protein Modeling*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1994. **29**(1): p. 1-68.
44. Kuchner, O. and F.H. Arnold, *Directed evolution of enzyme catalysts*. Trends in Biotechnology, 1997. **15**(12): p. 523-530.
45. Gaytan, P. and A. Roldan-Salgado, *Elimination of Redundant and Stop Codons during the Chemical Synthesis of Degenerate Oligonucleotides. Combinatorial Testing on the Chromophore Region of the Red Fluorescent Protein mKate*. Acs Synthetic Biology, 2013. **2**(8): p. 453-462.
46. LeProust, E.M., et al., *Synthesis of high-quality libraries of long (150mer) oligonucleotides by a novel depurination controlled process*. Nucleic Acids Research, 2010. **38**(8): p. 2522-2540.
47. Gaytan, P., et al., *TrimerDimer: an oligonucleotide-based saturation mutagenesis approach that removes redundant and stop codons*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(18): p. e125.
48. Yagodkin, A., et al., *Improved synthesis of trinucleotide phosphoramidites and generation of randomized oligonucleotide libraries*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2007. **26**(5): p. 473-97.
49. Yanez, J., et al., *Combinatorial codon-based amino acid substitutions*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(20): p. e158.
50. Virnekas, B., et al., *Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(25): p. 5600-7.
51. Virnekas, B., et al., *Trinucleotide Phosphoramidites - Ideal Reagents for the Synthesis of Mixed Oligonucleotides for Random Mutagenesis*. Nucleic Acids Research, 1994. **22**(25): p. 5600-5607.
52. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp* red fluorescent protein*. Nature Biotechnology, 2004. **22**(12): p. 1567-1572.
53. Tejerizo, G.T., et al., *Development of molecular tools to monitor conjugative transfer in rhizobia*. J Microbiol Methods, 2015. **117**: p. 155-63.
54. Terskikh, A., et al., *"Fluorescent timer": Protein that changes color with time*. Science, 2000. **290**(5496): p. 1585-1588.
55. Muslinkina, L., et al., *Two independent routes of post-translational chemistry in fluorescent protein FusionRed*. Int J Biol Macromol, 2020. **155**: p. 551-559.
56. Muslinkina, L., et al., *Structural Factors Enabling Successful GFP-Like Proteins with Alanine as the Third Chromophore-Forming Residue*. J Mol Biol, 2019. **431**(7): p. 1397-1408.
57. Wachter, R.M., *The family of GFP-like proteins: structure, function, photophysics and biosensor applications. Introduction and perspective*. Photochem Photobiol, 2006. **82**(2): p. 339-44.
58. Pletnev, S., et al., *Understanding blue-to-red conversion in monomeric fluorescent timers and hydrolytic degradation of their chromophores*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(7): p. 2243-53.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias  
Químicas e Ingeniería

FORMA T-4  
NOMBRAMIENTO DE COMITÉ REVISOR

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES y CACEI  
Certificada en la norma ISO 9000:2008

Cuernavaca, Mor., a 29 de octubre de 2021.

**DRA. AVE MARÍA COTERO VILLEGAS**  
**DRA. VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS**  
**MTRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA**  
**MTRO. VICTOR MANUEL NOGUEIRA Y CARDIN**  
**MTRA. MARIBEL OSORIO GARCÍA**

### PRESENTE

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** de la **TESIS** Titulada:

Mutagénesis combinatoria de tres aminoácidos localizados cerca del cromóforo de la proteína Roja Fluorescente mKate.

Que presenta la **C. ABIGAIL ADRIANA ROLDÁN SALGADO**, del programa educativo de **QUÍMICO INDUSTRIAL**.

ATENTAMENTE  
*Por una humanidad culta*

**DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ**  
**DIRECTORA**  
**DICTAMEN**

**DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNANDEZ**  
**DIRECTORA DE LA FCQeI**  
**PRESENTE**

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTAMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE	FIRMA
	<b>DRA. AVE MARÍA COTERO VILLEGAS</b>	
	<b>DRA. VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS</b>	
	<b>MTRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA</b>	
	<b>MTRO. VICTOR MANUEL NOGUEIRA Y CARDIN</b>	

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,  
Tel. (777) 329 70,00, Ext. 7039/ fcqei@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES y CACEI  
Certificada en la norma ISO 9000:2008

Aprobatorio	MTRA. MARIBEL OSORIO GARCÍA	
-------------	-----------------------------	--



Facultad de Ciencias  
Químicas e Ingeniería



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ** | Fecha:2021-11-03 17:20:45 | Firmante

DW0iudHxrAmYgrnjftO57GalUh6VUU7i9Q1aJRI3I283vAXh336F9KCPAinKqBQcgTijgzU5DuhtM3oluzCh5shgRR77dO2++HB750zHUS4YNqHgmbVRiqeGdWAGzquZrT14DdS  
0pHk2OVm3Ljx/lZZ5vtTnADB70I4G3o21WY64GOjU7GLVnk7CxXQQg2nsC85V+RGQYMW1juob6kXPbo4Q7Zd/goTIBmu+U/bAxlz6nnpLlIj6ujPbpgFXK8CvTnCelAf8YPWoNDe  
xhNePj8M1KaTBLL3YczG7yZ8eUKh5XsvgyG528fYVQd/UilJiVudyOsCsCF+qIkGB10sO1Q==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

[wxCgSEJqY](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/drXiAuyexjGn8weR0KfY1liih6Fn9MNe>

**UA  
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS** | Fecha:2021-12-27 07:41:25 | Firmante

wViWu9h8721lbg694+9kYiuoHg7BasYhZx6dH2AVQmbUuRGvhaAQTJZrRToWl7JWu5eMp7TFkZv4F07cn3NqTpxxF9TWkewvPy3Lw8SN81RNdVxEbDpJ4hIkBjEju+5mwLnPJI  
ISADuvbo1qFXBlol4zJNaknzn2+QxRvfQza1gA/CYjkXX3NftWsG8TBNQGgEaybcX114KLyMv7RNDpKvr4b0gqN1K4sS9dWVCSUNUUTu6Ep4tif2YNL8UQ+QXU84/lm+39su+p  
1lPhKowtPdsSbfR767c/7ly95PwmTUcEK2lXBqUh8nV355d8sHB2wJKe03ibtqR0xhWi+6Wg==

**AVE MARIA COTERO VILLEGAS** | Fecha:2021-12-27 19:19:22 | Firmante

RPL9GVu8Mfo5Y77bEOx0JkLPgSy4JIOSUvQaDcLfsFOGuDXqGaQXQqFGbsvhlwBV/kucZgpHrwnonGkdTQ1BelKwdbcvotT7e/D9A9Ou0pApsLL8rdJE3O1RUm0TBzqj5ZRx  
Piemx1MqumHVgCwE2RIUWg4f31w9as61a1CkJDJgNjEkXdenoJFYEiaf3fr8p+veu9jL8rxAyRbhmgKqG9yVLSuaxDoiUO9JqkGr7DqCpKn1vJWZG2N8InyUDHrKf6+rNsiWblf  
AE0lV7Lg1c4BEBBoRayBv3tCWwxmke8m1V8plLDAYhrVvAt4gQvAWGNQD5tS5s3o5UirCQ==

**MARIBEL OSORIO GARCIA** | Fecha:2022-01-15 21:47:33 | Firmante

d0yS2euuEG1k+iki158+1K1B12Q0ZDTnByEEemq7n9LIHsOzfJmROLZMtt+95rsRHQ4BrpiUhfqBEWJmZN5FOAIF4nVulO2/XZBPo0H94MffhN8xUEmsDKyWpMGdvlapyTTBH9  
mpZ8hWXbKvtu3+JxuSA3rv3hH86pTZBP2AsuCGt6INsPIB4GWHcJx6dm35zdkmJiHOXF3t8/LapJNp/bnF1ONRshXv5Bcg0eRRZrtsyF+c/QDovV+ccEDwDw0g83YtJK2oE0BQ  
nTE7bOe5R9LMp9YAbptRt23jVfPqG1s0CZvBWypMYXmBt+eSqw+OVoh2azxpPGscqYLqp90w==

**VICTOR MANUEL NOGUEIRA Y CARDIN** | Fecha:2022-01-21 13:37:19 | Firmante

MQB9mUII9eRIDaKnucsVZ2WD1OU/F0h9J74wRqLc9cb84gqWqppEPpySgfj+mW6sTP3M72P2jg8CkzkEFUGraY4hzBXHxeH5mmECAGbjgwPnkaZ9hx3zUb3fh362+HZuPNV  
7lcONDyWfKrrFc39bjnkaSDDuulMbK1TdQJgX0S9A6z7c4ph1uEHRP7kJs1pYkoq4iqfp7aa0XP1j8X/Uus7ZGzZ/8zwRyp000skgQIPOBmv9EiZTzI3czwT6hCQnsGpT2vu7mnnny  
xnyjaAHvP+cl8WaoDru8a3rjotYzRXBPqWccSdDalP03Yg71boNdeW0K/u9TAHky4DCAg==

**GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA** | Fecha:2022-01-21 18:51:42 | Firmante

xW2o96k5J9KmpcvGPPv8ElkryDIRUk1ECbaaeudRKzbnkKhdqAILx9wY8GVd7IN3i5DYzogdTDFEVXrQWrCz+cSTXgD2DYMjBUfZjTySDCOSYjU+GLrBTUVWXIQ1I29aU3  
37gUyW35iCjADqx1W0d3QRk4lFsdQwLgNW/fDJEQyFmN1Uy+25PAQCSty32HQ99d9aPkW/LTh0LmT011G+JGSHoELdmPAu6zuz2JcutEVru1M985tOVD7J6q9N3FMmxsGa  
l94CqXCQZDSIC+pGR1JHDJvt+ae6Prj1igN1ROfccJyWdX4rEmqAe5Cc1FLZyFRUY8T6VI9EHw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



08a1GpyWK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QRVK2U53XqVUZul5EaO7w2RoMODEPyE4>