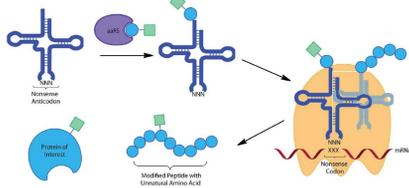


Introducción

• La Green Fluorescent Protein (GFP) es una proteína presente en la medusa *Aequorea victoria* que se ha estudiado extensamente por sus características espectroscópicas, estructurales y su aplicación como sonda en modelos celulares.

• Se expresa la sfGFP recombinante en su forma wt y su mutante sfGFP150 que presenta en la posición 150 de la estructura primaria un codón stop UAG en la secuencia. A través del uso de un par tRNA sintetasa y tRNA, seleccionados específicamente para cargar en el codón stop UAG residuos de 3-nitrotirosina se prepara una proteína nitrada en forma sitio específica (Figura 1).



• La incorporación de 3-nitrotirosina fue comprobada a través de western blot y por espectrometría de masa (Figura 2). Se analizan los espectros de excitación y emisión de la GFP mononitrada (GFP150) y se comparan con la wt (Figura 3). Se estudia la estabilidad térmica y frente a agentes desnaturante de ambas proteínas GFP150 y wt (Figura 4 y 5).

Purificación de GFP con nitración en tirosina sitio específica

• Se purifican las proteínas GFP wt y GFP150 a partir de cepa BL21ia utilizando un medio autoinducible (AI) y se purifica por medio de columna de níquel (Figura 1).

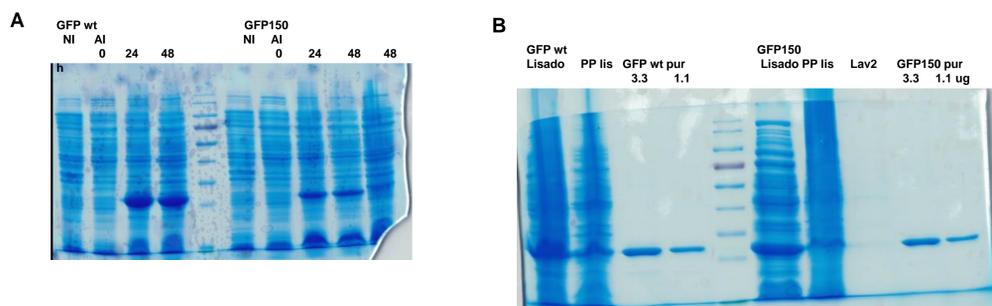


Figura 1. Geles SDS-PAGE de **A** bacterias BL21ia en medio Autoinducible (AI), y **B** purificación por columna de Ni²⁺ de GFP wt y GFP150.

Caracterización de la GFP y la forma mononitrada

• La GFP wt y GFP150 (mononitrada) se caracterizó por medio de western blot anti-nitroTyr y por espectrometría de masa (Figura 2).

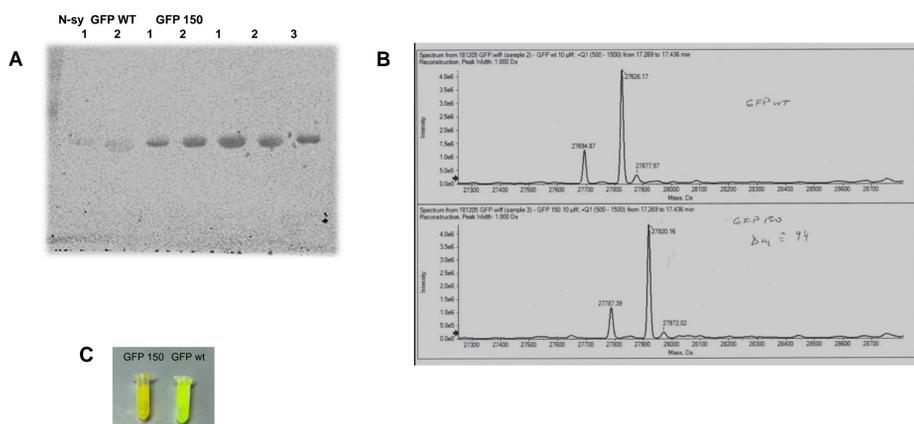


Figura 2. **A** Western anti-nitro Tyr policlonal, **B** espectrometría de masa GFP WT (arriba) GFP150 (abajo) y **C** imagen representativa de la purificación.

• Se demuestra que la GFP purificación presenta un residuo de 3-nitrotirosina.

Espectros de emisión y excitación de GFP mononitrada

• Espectros de excitación y emisión de GFP wt y GFP150.

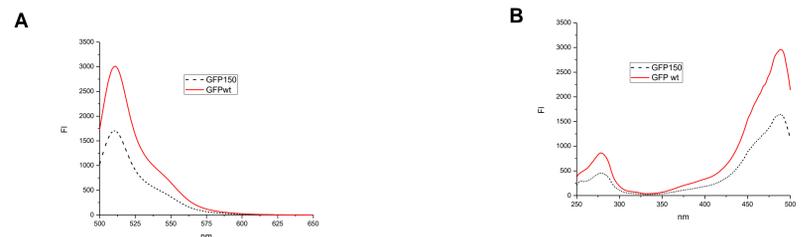


Figura 3. Espectros de emisión (**A**) y excitación (**B**) de GFP 150 mononitrada (línea punteada) y GFP wt (línea roja).

Estabilidad de la GFP mononitrada

• Estabilidad térmica y frente a agentes desnaturantes de GFP wt y GFP150 (mononitrada).

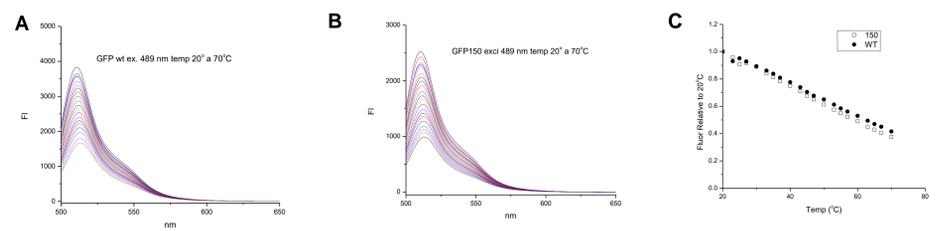


Figura 4. Análisis de la estabilidad térmica de la GFP wt (**A**) y GFP 150 (**B**) a través de espectros de emisión a distintas temperatura. En gráfico **C** se analiza la caída relativa del pico a 520 nm en función de la temperatura.

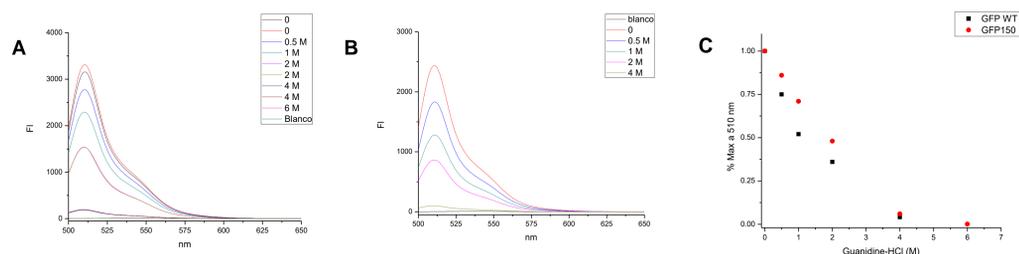


Figura 5. Análisis de la estabilidad frente a guanidinio-HCl de la GFP wt (**A**) y GFP 150 (**B**) a través de espectros de emisión a concentraciones crecientes de guanidinio (0 a 6 M). En gráfico **C** se analiza la caída relativa del pico a 520 nm en función de la concentración de guanidinio.

Conclusiones:

• Utilizando el sistema de expresión co-traduccional, se logró expresar y purificar una especie mononitrada de GFP en la posición 150.

• La especie mononitrada mostró similar estabilidad térmica y frente a desnaturantes que la proteína wt, sugiriendo un plegamiento correcto y similar a la wt.

• La GFP150 mononitrada muestra espectros de emisión y excitación similares a la wt pero con valores menores, implicando un efecto apantallador de la fluorescencia intrínseca de la GFP por la 3-nitrotirosina en la posición 150.

Agradecimientos:

Dr. Ryan Mehl y Dr. Richard Cooley, Biochemistry and Biophysic Department, Oregon State University, quienes nos cedieron los plásmidos pETGFPwt, pETGFP150 y pDULE2.