

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Interacción de la calmodulina con los canales Kv7.2 utilizando la técnica FRET: Estudios preliminares

Autora:

Jone Otegi Arzak

Director:

Dr. Diego Guerín Aguilar

Co-director:

Dr. Alessandro Alaimo

Leioa, 1 de septiembre de 2015

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Objetivos	2
MATERIALES Y MÉTODOS	3
Métodos de biología molecular (Clonajes)	3
Fragmentos y vectores de expresión.....	3
Digestión de fragmentos y vectores, purificaciones y ligaciones.....	3
Transformación química en bacterias <i>E.coli</i>	4
Extracción de ADN (miniprep)	5
Chequeos	5
Cultivos y expresión de proteínas en bacterias <i>E.coli</i>	5
Expresión en bacterias BL21 CodonPlus	6
Coexpresión mediante electroporación	6
Cultivos e inducción de la expresión.....	6
Obtención de proteínas	7
Experimentos FRET	7
Espectros de emisión de cada proteína.....	7
FRET	7
Experimentos de desplazamiento	8
Titulación con Ca^{2+}	8
RESULTADOS.....	8
Digestiones y chequeos	8
Expresión de proteínas	9
Estudios FRET	9
Espectros de emisión de cada proteína.....	10
FRET	11
Experimentos de desplazamiento	12
Titulación con Ca^{2+}	12
DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES	12
BIBLIOGRAFÍA	13

1. INTRODUCCIÓN:

La familia de canales de potasio dependientes de voltaje Kv7 (KCNQ) es de gran importancia en la excitabilidad tanto cardíaca como neuronal, y está involucrada en diferentes enfermedades tales como la epilepsia, la arritmia cardíaca o la sordera (Haitin y Attali, 2008). Existen cinco genes que codifican por canales Kv7 (*kcnq1-5*), de los cuales cuatro se expresan en el sistema nervioso (Brown y Passmore, 2009).

Este trabajo se ha centrado en el canal Kv7.2. En el sistema nervioso central, Kv7.2 junto con Kv7.3 forma el substrato molecular de la corriente M que tiene una gran trascendencia en la excitabilidad neuronal. Cuatro subunidades se ensamblan para formar homo- o heterotetrámeros funcionales. Cada subunidad Kv7.2 está formada por seis dominios transmembrana (S1-S6) y sus extremos N- y C-terminales se extienden en el citoplasma. Particularmente interesante es la región C-terminal, que es sede de interacciones con proteínas y lípidos que regulan la actividad del canal, por lo que está implicada en múltiples procesos. En esta región podemos distinguir 4 segmentos llamados hélices A, B, C y D (Yus-Nájera et al., 2002).

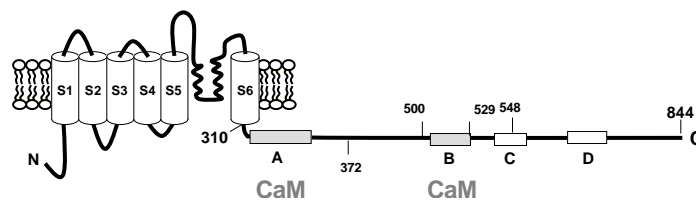


Figura 1: Representación de una subunidad del canal Kv7.2. Los segmentos S1-S4 representan el sensor de voltaje y los segmentos S5-S6 el poro del canal. En la región C-terminal, las hélices A y B forman el dominio de unión a la CaM.

Entre las proteínas implicadas en la modulación de estos canales, la calmodulina (CaM) juega un papel fundamental. La CaM es una proteína que se expresa en todas las células eucariotas, que une Ca^{2+} y está implicada en la regulación de una miríada de procesos celulares (Villarroya et al., 2014). Se ha demostrado que la CaM se une a un dominio formado por las hélices A y B (Yus-Nájera et al., 2002) y se ha propuesto que puede actuar como sensor de Ca^{2+} modulando la apertura o el cierre de los canales Kv7 y regular el tráfico a la membrana plasmática (Haitin y Attali, 2008; Alaimo et al., 2009).

En este trabajo nos propusimos estudiar *in vitro* la interacción entre la CaM y los canales Kv7.2 mediante la técnica FRET. El fenómeno FRET (Förster resonance energy transfer) fue descubierto en 1948 por el físicoquímico alemán que le da nombre, Theodor Förster. Este fenómeno se da cuando un fluoróforo excitado (el donante) transfiere energía a otra molécula (el aceptor) mediante acoplamiento dipolo-dipolo. Cuando el aceptor también es un fluoróforo, para pasar del estado excitado al relajado emite energía en forma de fotones, produciendo fluorescencia (Sahoo, 2011).

Para que esto suceda deben cumplirse ciertos requisitos: los espectros de emisión y de absorción de los fluoróforos deben solaparse, y estos necesitan encontrarse orientados de una manera concreta y a una distancia entre 10-80 Å. Dado que la información que puede obtenerse mediante este fenómeno está en el rango de la dinámica molecular atómica, hoy en día su utilización se ha centrado en el análisis de interacciones proteína-proteína o cambios conformacionales de proteínas *in vivo* (Truong e Ikura, 2001).

La Green Fluorescent Protein (GFP), una proteína identificada y aislada del *Aequorea victoria*, fue caracterizada a manos del científico americano Roger Y. Tsien (Tsien, 1998). De esta proviene la paleta de proteínas fluorescentes variantes que se suelen emplear en estudios de FRET (Heim y Tsien, 1996). Todas ellas comparten la misma estructura β -barril, con un cromóforo en el interior. Esta estructura, además de ser vital para que se dé la fluorescencia, confiere una gran estabilidad a las proteínas. Cada variante tiene características propias como la vida media de fluorescencia, características fotoquímicas o rendimiento cuántico (Stepanenko et al., 2013).

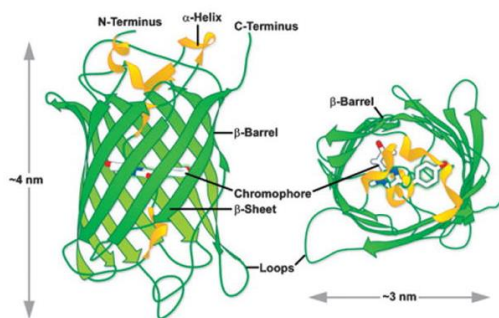


Figura 2: Estructura β -barril de la proteína GFP de *A. Victoria*. En su interior se encuentra el cromóforo. La imagen está basada en la estructura depositada en Protein Data Bank, ID: 1w7s (Day y Davidson, 2010).

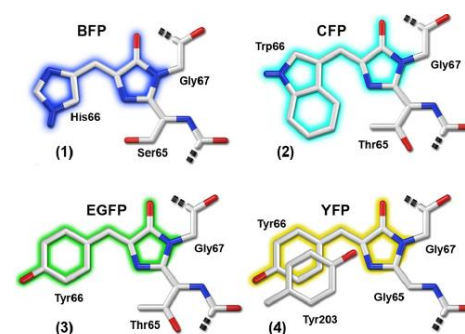


Figura 3: Estructuras de algunos cromóforos. (1) BFP; (2) CFP; (3) EGFP; (4) YFP (Shaner et al., 2007).

1.1. Objetivos:

- Realizar los clonajes del C-terminal del canal Kv7.2 (hélices A-B) y la CaM etiquetándolas con proteínas fluorescentes tanto en el N-terminal como en el C-terminal.
- Transformar bacterias BL21 CodonPlus y cotransformar bacterias electrocompetentes con las combinaciones de proteínas, e inducir su expresión.
- Estudiar el FRET entre las proteínas fluorescentes y relacionarlo con las posibles interacciones CaM-Kv7.2 . Para ello:
 - o Medir FRET en parejas de proteínas marcadas y cotransformadas.
 - o Realizar experimentos de desplazamiento como se describe más adelante.
 - o Estudiar el efecto del calcio en la interacción CaM-Kv7.2.

- Identificar cuál de las combinaciones donantes-aceptores es la óptima para después profundizar en su estudio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1. Métodos de biología molecular (Clonajes)

2.1.1. Fragmentos y vectores utilizados

Los ADNs que codifican por proteínas fluorescentes utilizados son Citrina, mcp-Venus173, mCFP y mTFP1. Estas se emplean para etiquetar el dominio C-terminal del canal Kv7.2 (hélices A-B) y la CaM, siendo colocadas en algunos casos en el extremo N-terminal y en otros en el C-terminal. De este modo, se pueden crear distintas combinaciones de proteínas fluorescentes y observar como la posición del fluoróforo puede influir en los resultados (**Figura 3**). Para expresar o coexpresar los constructos en bacterias, se emplean dos vectores con distinta resistencia a antibióticos: en el caso de la CaM se emplea el vector pOKD4 (resistencia a Kanamicina), mientras que el vector pPROHEX-HTc (resistencia a Ampicilina) es el elegido para clonar las hélices AB del canal Kv7.2. Teniendo todo esto en cuenta, los clonajes a realizar son los siguientes:

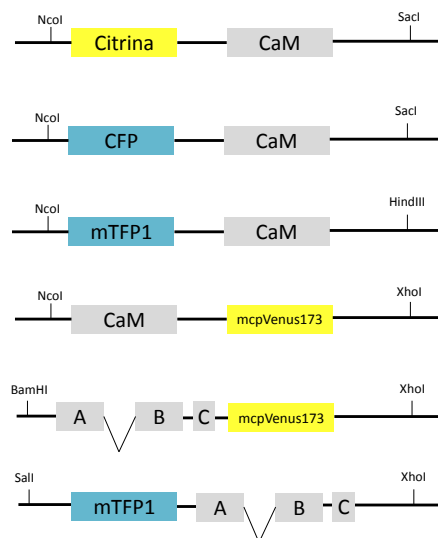


Figura 3: Esquemas de clonajes. JO-01: N-term-Citrina-CaM; JO-02: N-term-mCFP-CaM; JO-03: N-term-mTFP1-CaM; JO-04: C-term-CaM-mcp-Venus173; JO-05: C-term-mcp-Venus173-Kv7.2 AB; SA-70: N-term-mTFP1-Kv7.2 AB.

2.1.2. Digestión de fragmentos y vectores, purificaciones y ligaciones:

Tanto los vectores a utilizar como los fragmentos de ADN de interés, se digieren durante 4 h a 37°C con las enzimas de restricción indicadas en la **Tabla 1**, y se neutraliza la reacción con el tampón de carga 10x (50% glicerol, 0,2 M EDTA pH 8, 0,05% w/v azul bromofenol). Después se realiza una electroforesis en gel de agarosa (1%) en tampón TBE 1x (para 1 l de TBE 5x: 54 g Tris, 57,5 ml ac.

bórico, 20 ml de EDTA 0,15 M pH 8) para poder separar el vector del fragmento. Para tener una referencia del tamaño de cada banda se utiliza el marcador de ADN fago lambda, digerido con BstEII (Fermentas), y los geles de agarosa llevan bromuro de etidio a modo de agente intercalante, para marcar las hebras de ADN.

Tabla 1: Protocolo de digestiones.

	ADN	Buffer [10x]	Enzimas	H₂O
JO-01 y JO-02	2 µl Vector (pOKD4)	2 µl Buffer Y+	0,5 µl NcoI 1 µl SacI	14,5 µl
	2 µl Fragmento	2 µl Buffer Y+	0,5 µl NcoI 1 µl SacI	14,5 µl
JO-03	2 µl Vector (pOKD4)	2 µl Buffer Y+	0,5 µl NcoI 1 µl HindIII	14,5 µl
	2 µl Fragmento	2 µl Buffer Y+	0,5 µl NcoI 1 µl HindIII	14,5 µl
JO-04	2 µl Vector (pOKD4)	4 µl Buffer Y+	0,5 µl NcoI 0,5 µl XhoI	13,5 µl
	2 µl Fragmento	4 µl Buffer Y+	0,5 µl NcoI 0,5 µl XhoI	13,5 µl
JO-05	1 µl Vector (pPROHEX-HTc)	2 µl Buffer BamHI	0,5 µl BamHI 1 µl XhoI	15,5 µl
	2 µl Fragmento	2 µl Buffer BamHI	0,5 µl BamHI 1 µl XhoI	14,5 µl
SA-70	2 µl Vector (pPROHEX-HTc)	2 µl Buffer O ⁺	0,5 µl SalI 1 µl XhoI (Religar)	14,5 µl

Las bandas correspondientes al vector y al fragmento se extraen del gel y se purifican mediante el kit de purificación comercial GeneJet Gel Extraction (K0692, Fermentas).

Una vez que el fragmento y el vector están purificados, se ponen a ligar con T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante toda la noche. Para ello se emplea el protocolo de la **Tabla 2**.

Tabla 2: Protocolo de ligaciones.

Fragmento digerido	Vector digerido	Ligasa (T4)	Buffer de ligasa [10x]
7,5 µl	1 µl	0,5 µl	1 µl

2.1.3. Transformación química en bacterias *E.coli*:

Las ligaciones obtenidas se transforman en la cepa bacteriana *E. coli* BSJ, previamente preparadas para ser competentes. A 100 µl de células competentes se añaden 5 µl de plásmido y 45 µl de tampón de transformación (TB 2X: MgCl₂ 40 mM, CaCl₂ 20 mM). Se mezcla, se mantiene en hielo durante 20 min y a continuación se efectúa un choque térmico a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se añaden 900 µl de LB (medio líquido Luria-Bertani) sin antibiótico y se incuba durante 45 min a 37°C. Finalmente, las células se centrifugan durante 30 s a 13.000 g. Se eliminan

900 µl del sobrenadante y los 100 µl restantes se resuspenden y se siembran en placas de LB con antibiótico (Ampicilina 100 µg/ml o Kanamicina 25 µg/ml). Se incuban a 37°C hasta que aparecen colonias (mínimo 8 h).

2.1.4. Extracción de ADN (miniprep)

La miniprep es un proceso mediante el cual se obtiene de ADN en pequeñas cantidades de forma rápida. Para ello se pican 4-5 colonias de cada placa utilizando palillos estériles y se trabaja a la llama de un mechero Bunsen para mantener las condiciones de esterilidad. Una vez picadas las colonias, los palillos se introducen en un tubo de ensayo estéril ventilado en el cual se han vertido 3 ml de medio LB y antibiótico, y se dejan a 37°C en agitación durante una noche. Una vez que las bacterias hayan crecido, se separan 2 ml de cultivo, se pasan a un tubo eppendorf de 2 ml y se da comienzo al siguiente protocolo: (1) centrifugar brevemente a velocidad máxima los tubos; (2) resuspender el precipitado bacteriano en TE 1X; (3) lisis alcalina de la suspensión de bacterias en medio de 0,2 M NaOH/ 1% SDS; (4) neutralización mediante 3 M acetato potásico, 5 M ac. acético; (5) separación de proteínas de lípidos gracias a extracción con fenol/cloroformo (25:24); (6) recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo; (7) precipitar el ADN con isopropanol; (8) lavar con etanol 70% y resuspender con TE 1X ARNasa. Con este protocolo se suele obtener una concentración de ADN de aprox. 1-2 µg/µl.

2.1.5. Chequeos:

Para asegurarse de que el clonaje resultante sea el que previamente se había diseñado, se realiza un chequeo incubando los ADNs con enzima de restricción (2 h) y corriendo geles de agarosa al 1% o 2% en tampón de electroforesis TBE 1X, siguiendo el protocolo de la **Tabla 3**. En algunas ocasiones resulta necesario enviar las construcciones clonadas al servicio de secuenciación de ADN Secugen de Madrid.

Tabla 3: Protocolo de chequeos.

ADN	Enzima	Buffer	H ₂ O
1 µl JO-01	0,2 µl BsrGI	2 µl Buffer Y+ [10X]	16,8 µl
2 µl JO-02	0,2 µl BsrGI	2 µl Buffer Y+ [10X]	15,8 µl
1 µl JO-03	0,2 µl NcoI 0,4 µl HindIII	2 µl Buffer Y+ [10X]	16,4 µl
1 µl JO-04	0,2 µl NcoI 0,2 µl XhoI	4 µl Buffer Y+ [10X]	14,6 µl
2 µl JO-05	0,2 µl BamHI 0,4 µl XhoI	2 µl Buffer BamHI	15,4 µl
2 µl SA-70	0,2 µl NcoI 0,4 µl HindIII	2 µl Buffer Y+ [10X]	16,4 µl

2.2. Cultivos y expresión de proteínas en bacterias *E.coli*

2.2.1. Expresión en bacterias BL21 CodonPlus

Una vez logrados los clonajes, el siguiente objetivo es expresar en bacterias cada proteína por separado. Para ello se utiliza la cepa BL21-CodonPlus, que permite obtener altos niveles de expresión gracias a la presencia de copias extra de genes que codifican tARNs que suelen limitar la traducción de proteínas heterólogas en *E. coli*. Para transformarlas se emplea el mismo protocolo de transformación química descrito, con la diferencia de que a 50 µl de bacterias se les añade 1 µl de ADN. Además, con estas bacterias hay que añadir también antibiótico cloranfenicol al medio (35 µg/ml).

2.2.2. Coexpresión mediante electroporación

Para cotransformar dos plásmidos en bacterias electrocompetentes se sigue el siguiente protocolo: (1) se añaden 50 µl de bacterias a una cubeta de electroporación en la cual previamente se han mezclado 0,5 µl de cada plásmido, (2) se inserta la cubeta en el electroporador y se da un pulso de 8 ms, (3) inmediatamente se añade 1 ml de medio LB y se pasa toda la mezcla a un eppendorf de 1,5 ml para incubarla durante 35 min a 37°C. A partir de este punto se repiten los pasos del protocolo de transformación química. Las parejas de proteínas cotransformadas son las siguientes:

- A. JO-01 (N-term-Citrina-CaM) + SA-70 (N-term-mTFP1-Kv7.2AB)
- B. JO-02 (N-term-mCFP-CaM) + JO-05 (C-term-mcp-Venus173-Kv7.2AB)
- C. JO-03 (N-term-mTFP1-CaM) + JO-05 (C-term-mcp-Venus173-Kv7.2AB)
- D. JO-04 (C-term-mcp-Venus173-CaM) + SA-70 (N-term-mTFP1-Kv7.2AB)

También se realizan ensayos de desplazamiento. Para ello se cotransforman la CaM silvestre con las hélices AB del canal Kv7.2 (JO-05 y SA-70, respectivamente) en el vector pOKD4 empleando el mismo protocolo. Para realizar los desplazamientos se utilizan los clonajes GB-149 (C-term-mTFP1-CaM) y AV-372 (N-term-mcp-Venus173-CaM) respectivamente.

2.2.3. Cultivos e inducción de la expresión

El proceso de producción de proteínas empieza picando con un palillo unas colonias de placas de LB-agar, más el correspondiente antibiótico, y se dejan crecer en 3 ml a 37°C durante toda la noche. Este inóculo se diluye 1/50 en 10 ml de LB-antibiótico y se vuelve a crecer a 37°C en agitación hasta semi-saturación ($DO_{600} = 0,6-0,8$). Con estos valores de densidad óptica nos encontramos en la fase exponencial de crecimiento de las bacterias y entonces se induce la expresión de las proteínas añadiendo IPTG 0,5 mM. A continuación, las células se incuban a 37°C durante 3 h. Finalmente se

recuperan las bacterias por sedimentación, centrifugando a 7000 g durante 10 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado bacteriano se congela y se guarda a -20°C hasta su uso.

2.2.4. Obtención de proteínas

El precipitado bacteriano procedente de 10 ml de cultivo se resuspende en 500 uL de tampón de fluorescencia (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, KCl 120 mM, NaCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, 10 mM EGTA) frío complementado con un comprimido de cóctel de inhibidores de proteasas (para 50 ml de tampón, Complete, Roche). Se somete a sonicación (2-3 ciclos de 12 s en hielo). Se centrifuga a 13.000 g durante 10 min a 4°C y se pasa el sobrenadante a unos tubos limpios. Esta fracción soluble, que guardamos a 4°C, representa el material de partida para poder realizar los ensayos de FRET. La expresión de las proteínas se analiza corriendo las muestras en geles de SDS/PAGE al 10 o 12%. Tratándose de proteínas fluorescentes, para preservar su estructura terciaria (importante para la fluorescencia), las muestras no se calientan. La visualización de las banda de realiza excitando a 488 y 555 nm utilizando el aparato Versadoc 4000 (Biorad). Finalmente, los geles se someten a tinción con Coomassie.

2.3. Experimentos FRET

Los experimentos de FRET se realizan en un espectrofluorímetro Aminco Bowman serie 2 (SLM Aminco), usando cubetas de cuarzo. Las muestras se diluyen en el siguiente tampón: Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, KCl 120 mM, NaCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 10 mM. El volumen final de las muestras es de 100 µl y se trabaja a 25°C. Los ensayos a llevar a cabo son:

- **Espectros de emisión de cada proteína:** Para lograr los espectros de emisión, se utilizan las longitudes de onda de excitación y emisión correspondientes a los distintos fluoróforos, como se reporta en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Longitudes de onda de excitación/emisión para mediciones con proteínas fluorescentes.

Proteína fluorescente	Excitación (nm)	Emisión (nm)
mcp-Venus173	515	528
Citrina	515	528
mTFP1	462	492
mCFP	433	475

- **FRET:** Los sobrenadantes que contienen las parejas donantes-aceptores se diluyen en el tampón y se excitan las muestras a las longitudes de onda de excitación del donante. Se recogen los espectros de emisiones en el rango de longitudes de onda esperados de los donantes y aceptores (ver **Tabla 5**).

Tabla 5: Longitudes de onda de excitación/emisión para mediciones con parejas de proteínas fluorescentes.

Proteínas fluorescentes	Excitación (nm)	Emisión (nm)
mCFP + mcp-Venus173	433	528
mTFP1 + mcp-Venus173 y mTFP1 + Citrina	462	528

- **Ensayos de desplazamiento:** Se miden los espectros de emisión de JO-05 + CaM y de SA-70 + CaM. A continuación, se añaden pequeñas alícuotas de GB-149 y de AV-372, respectivamente. La aparición de un segundo pico en el espectro de emisión debido al FRET entre las proteínas fluorescentes se puede interpretar en términos de desplazamiento de la CaM salvaje.

- **Titulación de Ca^{2+} :** Se preparan 10 eppendorf, cada uno con 10 μ l de JO-04 + SA-70 y un volumen final de 100 μ l (tampón de fluorescencia). A los eppendorf se les añade un volumen ascendente de Ca^{2+} entre 0-9 μ l (correspondiente a 0-9 mM) para realizar la titulación. Se dejan incubar durante 2 h y se miden los espectros.

3. RESULTADOS

3.1. Digestiones y chequeos

Para poder llevar a cabo los clonajes planteados (**Figura 3**), se han digerido los vectores y fragmentos de interés, se han purificado y ligado (**Tablas 1 y 2**), y finalmente se han transformado bacterias *E.Coli*. Para comprobar que los clonajes se han realizado correctamente, se han hecho chequeos con distintas enzimas de restricción en cada caso (**Tabla 3**).

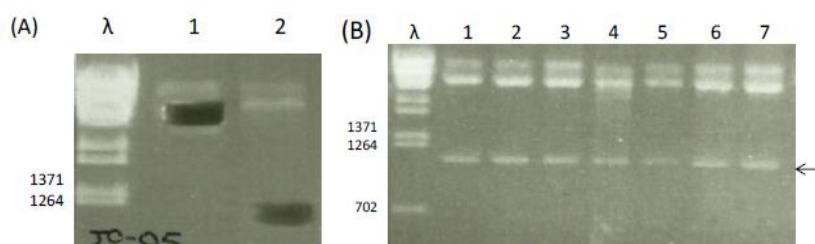


Figura 5: Geles de agarosa al 1% con las digestiones y los chequeos de JO-05. (A) Digestiones. Calle λ : marcador de peso molecular; calle 1: digestión mediante BamHI y XhoI y purificación del vector pOKD4; Calle 2: digestión mediante BamHI y XhoI y purificación del fragmento N-term-Citrina-CaM. El resto de vectores y fragmentos se han obtenido de forma análoga. (B) Chequeos. Calle λ : marcador de peso molecular; calles 1-7: digestión de las minipreps de la construcción JO-05 con BamHI y XhoI.

Aunque solo se expongan los geles del clonaje JO-05 por falta de espacio (**Figura 5**), con el resto de clonajes los resultados son los esperados: se han obtenido bandas de hebras de ADN de 500 (JO 01-02), 1200 (JO 03-04) y 1000 (JO 05) bp.

3.2. Expresión de proteínas (geles)

Tras comprobar que los constructos son correctos, se ha transformado cada clonaje en bacterias BL21 Codonplus, y después se induce su expresión mediante IPTG. A primera vista puede comprobarse como las colonias, al ser excitadas mediante un haz de luz de 488 o 555 nm utilizando el aparato Versadoc 4000, emiten fluorescencia (**Figura 6**). Para comprobar que su expresión es correcta, se corre un gel de poliacrilamida al 10 o 12%. Tratándose de proteínas fluorescentes, para preservar su estructura terciaria las muestras no se calientan antes de ser cargadas en el gel:



Figura 6: Placa con bacterias cotransfectadas mediante JO-04 + SA-70. Se han visualizado las colonias excitado la muestra a 488 nm mediante Versadoc 4000.

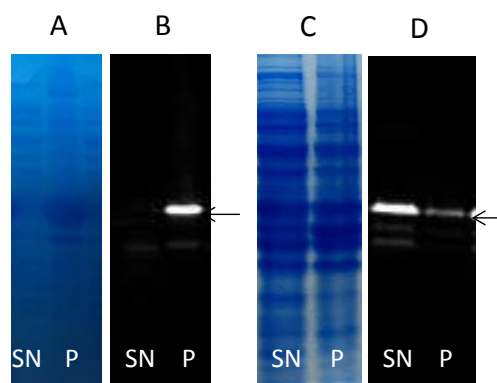


Figura 7: Geles seminativos de expresión de SA-70 (N-term-mTFP1-Kv7.2 AB en pPROHEX-HTc). (A) y (B) son geles con la proteína expresada por su cuenta; (C) y (D) son geles con la proteína coexpresada junto con CaM silvestre (en pOKD4). (A) y (C): los geles se encuentran teñidos mediante azul de Coomassie. (B) y (D): los geles sin teñir se irradian con un haz de luz de 488 nm. SN: Sobrenadante; P: Pellet.

En este caso tampoco se muestran los resultados por falta de espacio, pero todos los geles obtenidos muestran una banda de proteína sobreexpresada de 44 kDa en el caso de los constructos que contienen la CaM (JO-01,-02,-03,-04) y de 37 kDa en el de los constructos realizados con el canal (JO-05 y SA-70). Tal y como podemos ver en la **Figura 7**, la proteína SA-70 (N-term-mTFP1-Kv7.2 AB) es insoluble cuando es expresada por su cuenta, ya que podemos ver que al excitarla con un haz de luz de 488 nm la proteína aparece en el pellet; en cambio, al coexpresarla con CaM silvestre, la proteína aparece sobreexpresada en el sobrenadante. Este resultado sugiere que la CaM ayuda a solubilizar y replegar la SA-70. El mismo resultado se ha obtenido cotransformando JO-05 con CaM.

3.3. Estudios FRET

- Espectros de emisión de cada proteína

Para llevar a cabo los estudios FRET, primero se ha excitado cada proteína por separado con la longitud de onda apropiada (**Tabla 4**) y se han recogido sus espectros de emisión. De esta manera se pretende comprobar la funcionalidad de los fluoróforos empleados para etiquetar, y tener unos espectros a modo de control para realizar comparaciones posteriormente al cotransformar los constructos y observar el fenómeno FRET.

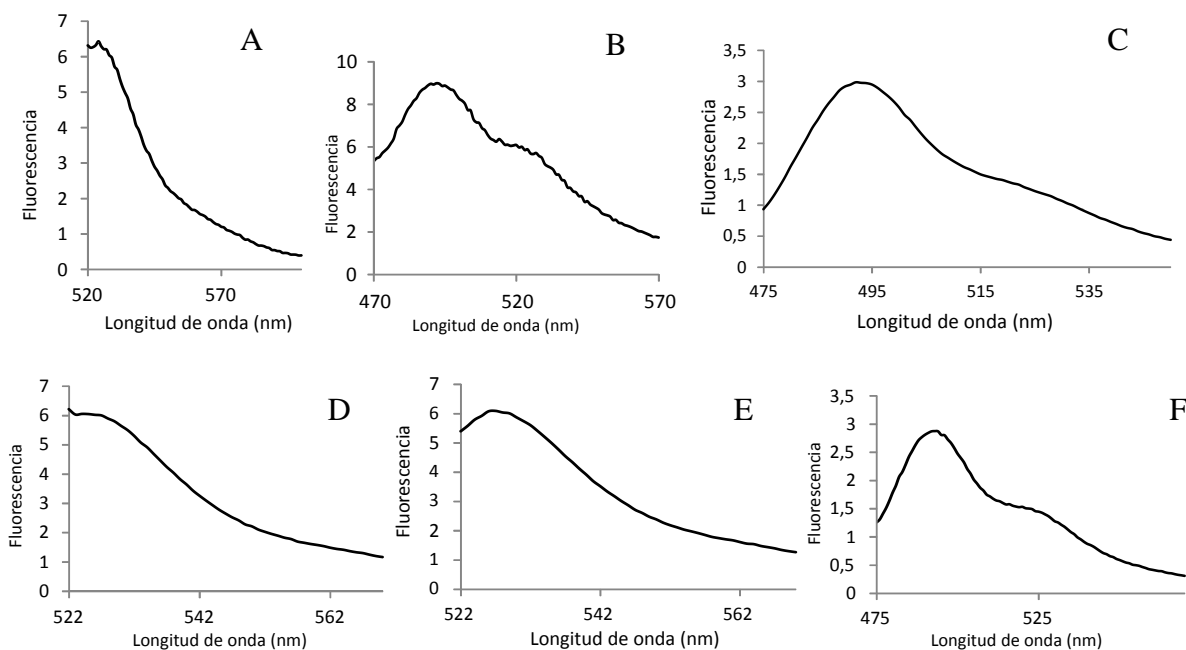


Figura 8: Espectros de emisión. (A): JO-01 N-term-Citrina-CaM; (B): JO-02 N-term-mCFP-CaM; (C): JO-03 N-term-mTFP1-CaM; (D) JO-04 C-term-CaM-mcp-Venus173; (E) JO-05 C-term-mcp-Venus173-Kv7.2 AB; (F): SA-70 N-term-mTFP1-Kv7.2 AB.

Los espectros obtenidos (**Figura 8**) muestran cómo las proteínas etiquetadas con Citrina y mcp-Venus173 (A, D, E) tienen un máximo de emisión a 528 nm. A su vez, las etiquetadas con mTFP1 (C, F) muestran un máximo a 492 nm, y la etiquetada con mCFP (B) tiene un máximo a 475 nm. Además, puede observarse cómo las proteínas etiquetadas con un fluoróforo del espectro de luz azul tienen un segundo pico mucho menos definido alrededor de 520 nm, dadas las características de los fluoróforos empleados.

- FRET

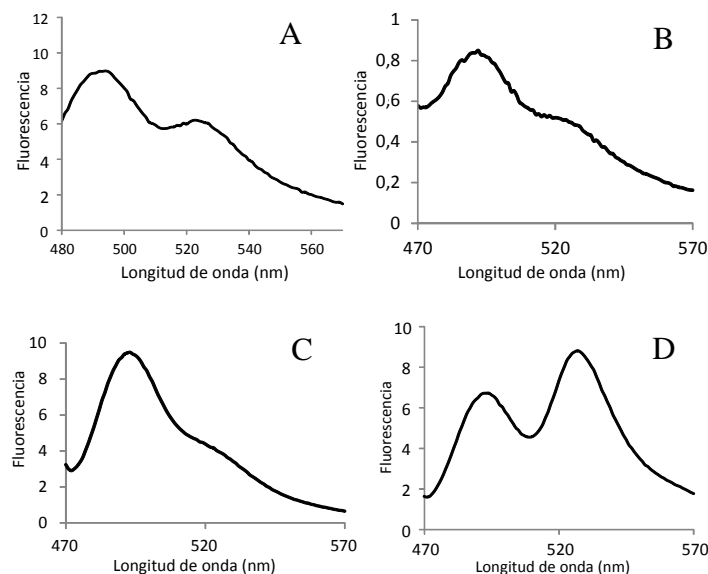


Figura 9: Espectros de emisión. (A): JO-01 N-term-Citrina-CaM + SA-70 N-term-mTFP1-Kv7.2 AB; (B): JO-02 N-term-mCFP-CaM + JO-05 C-term-mcp-Venus173-Kv7.2 AB; (C): JO-03 N-term-mTFP1-CaM + JO-05 C-term-mcp-Venus173-Kv7.2 AB; (D) JO-04 C-term-CaM-mcp-Venus173 + SA-70 N-term-mTFP1-Kv7.2 AB.

Tras excitar las parejas de proteínas (**Tabla 5**) se han recogido sus correspondientes espectros de emisión. Se intuye un efecto FRET en tres de los cuatro ensayos (**Figura 9: A, B, D**), aunque claramente la pareja de proteínas que mejor resultado da es la formada por JO-04 y SA-70. Por lo tanto, esta es la pareja más prometedora y la que se emplea para los posteriores ensayos.

- Ensayos de desplazamiento

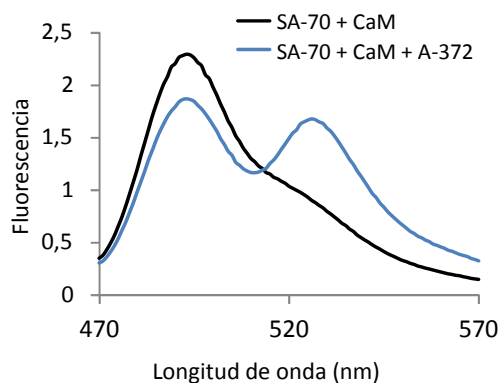


Figura 10: Espectros de emisión. SA-70 N-term-mTFP1-Kv7.2AB + CaM, desplazada mediante AV372 C-term-mcp-Venus173-CaM. En ambos casos se ha excitado la muestra a 462 nm y se ha recogido el espectro de emisión entre 470 y 570 nm.

Los espectros de emisión logrados (**Figura 10**) muestran cómo al añadir la CaM etiquetada (AV372, N-term-mcp-Venus173-CaM) se da un desplazamiento de la CaM silvestre, que se traduce a modo de reducción de intensidad del primer máximo (mTFP1) y aparición de un segundo máximo alrededor de 528 nm (mcp-Venus173). Esto podría evidenciar algún tipo de interacción espacial entre el canal y la CaM marcada.

- Titulación con Ca²⁺

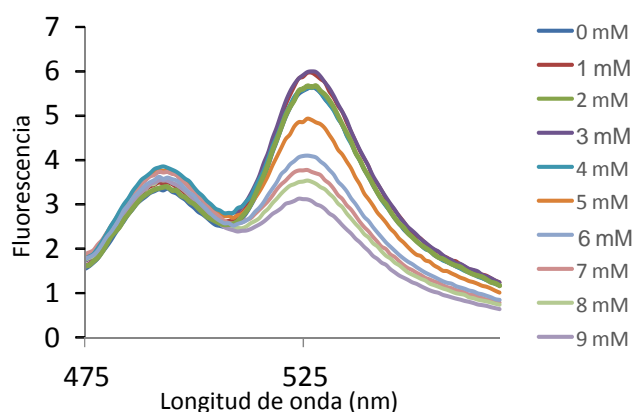


Figura 11: Espectros de emisión. La pareja de proteínas SA-70 (N-term-mTFP1-Kv7.2AB) + JO-04 (C-term-CaM-mcp-Venus173) en ausencia de Ca²⁺ (espectro azul oscuro) y tras añadir distintas cantidades de Ca²⁺ (ver apartado "Titulación de Ca²⁺" de estudios FRET) hasta 9 mM (espectro lila). En todos los casos se ha excitado la muestra a 462 nm y recogido el espectro de emisión entre 470 y 570 nm.

Una vez llevado a cabo el ensayo de titulación (**Figura 11**), puede observarse cómo a 0 mM de Ca^{2+} el efecto FRET es el máximo, y a medida que aumenta la concentración de Ca^{2+} , aunque el primer máximo referente a la proteína azul más o menos se mantiene, el efecto FRET se va reduciendo. Esto puede significar que en ausencia de Ca^{2+} la interacción entre la CaM y el canal Kv7.2 es más estable, y a medida que aumenta la concentración del ion este se une a la CaM, que se reorienta y posiblemente cambia de conformación, hasta finalmente disociarse de las hélices AB del canal. Esto explicaría la reducción de FRET.

4. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que los realizados son experimentos preliminares sin purificación ni cuantificación de las proteínas empleadas, los resultados sirven como referencia para futuros ensayos. Se ha podido comprobar que la CaM es una proteína que interacciona con el canal Kv7.2, como ya ha quedado demostrado en estudios anteriores. La pareja de proteínas fluorescentes que mejores resultados ha dado ha sido la formada por JO-04 (C-term-mcp-Venus173-CaM) y SA-70 (N-term-mTFP1-Kv7.2AB). Gracias a esto ha podido comprobarse cómo influye la colocación del fluoróforo en el C- o N-terminal de cada proteína a la hora de observar interacciones entre estas. En los resultados obtenidos en cuanto a expresión de proteínas, ha podido verse que el segmento AB del canal Kv7.2 se expresa como cuerpos de inclusión, aunque al coexpresarlo junto con la CaM se solubiliza. La CaM pues ayuda el repliegamiento de las hélices AB y su solubilización. Al tratarse de estudios FRET intermoleculares, la estequiometría de los aceptores y donantes puede variar dadas posibles diferencias en la eficiencia de transfección. Por lo tanto, los resultados obtenidos en los estudios de cotransfección no son precisos, ya que para poder determinar si se da el efecto FRET hace falta llevar a cabo estudios concretos como métodos de correcciones matemáticas que puedan ayudar a deducir dicha estequiometría y así cuantificar la eficiencia del efecto FRET. Esto no se ha llevado a cabo ya que se trata de un estudio preliminar que debe servir como referencia sin tener que invertir excesivo tiempo en ello. El experimento de desplazamiento utilizando CaM etiquetada llevado a cabo con SA-70 (N-term-mTFP1-Kv7.2AB), además de ser otra evidencia de las interacciones entre ambas proteínas, sirve para demostrar que el canal Kv7.2 y la CaM no se encuentran constitutivamente unidos. La titulación mediante Ca^{2+} muestra cómo la presencia de este catión en el medio afecta en las interacciones entre el segmento AB del Kv7.2 y la CaM. Una explicación posible es que la CaM, al tener sitios de unión para Ca^{2+} se una a él y sufra algún tipo de cambio conformacional por el cual deje de interactuar con el canal.

5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que los ensayos llevados a cabo se han hecho de forma rápida y por lo tanto las condiciones experimentales no han sido las óptimas, se puede concluir que:

- Los experimentos FRET llevados a cabo confirman que el dominio formado por las hélices A y B de Kv7.2 interacciona con la CaM, y que la ausencia o presencia de Ca^{2+} interfiere en dichas interacciones.
- La pareja de fluoróforos que mejores resultados han dado ha sido la formada por JO-04 (C-term-mcp-Venus173-CaM) y SA-70 (N-term-mTFP1-Kv7.2AB), por lo que sería interesante seguir investigando con mayor precisión las interacciones mencionadas partiendo de estos constructos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alaimo A., Gómez-Posada J.C., Aivar P., Etxeberria A., Rodríguez-Alfaro J.A., Areso P. and Villarroel A. (2009). Calmodulin Activation Limits the Rate of KCNQ2 K⁺ Channel Exit from the Endoplasmatic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 284(31), 20668-20675.
- Brown D.A. and Passmore G.M. (2009). Neural *KCNQ* (Kv7) channels. *Brit. J. Pharmacol.* 156, 1185-1195.
- Day R.N. and Davidson M.W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.* 38(10), 2887–2921.
- Haitin Y. and Attali B. (2008). The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *J. Physiol.* 586, 1803-1810.
- Heim R. and Tsien R.Y. (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* 6(2), 178-182.
- Sahoo H. (2011). Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications. *J. Photochem. Photobiol.* 12, 20-30.
- Shaner N.C., Patterson G.H. and Davidson M.W. (2007). Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell. Sci.* 120, 4247-4260.
- Stepanenko O.V., Stepanenko O.V., Kuznetsova I.M., Verkusha V.V. and Turoverov K.T. (2013). Beta-Barrel Scaffold of Fluorescent Proteins: Folding, Stability and Role in Chromophore Formation. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 302, 221–278.
- Truong K. and Ikura M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes *in vivo*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 573-578.
- Tsien R.Y. (1998), The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Chem.* 67, 509-544.
- Villarroel A., Tagliatalata M., Bernardo-Seisedos G., Alaimo A., Agirre J., Alberdi A., Gomis-Perez C., Soldovieri M.V., Ambrosino P., Malo C. and Areso P. (2014). The Ever Changing Moods of Calmodulin: How Structural Plasticity Entails Transductional Adaptability. *J. Mol. Biol.* 426, 2717-2735.
- Yus-Nájera E., Santana-Castro I. and Villarroel A. (2002). The identification and characterization of a noncontinious calmodulin-binding site in nonactivating voltaje-dependent KCNQ potassium channels. *J. Biol. Chem.* 277, 28545-28553.