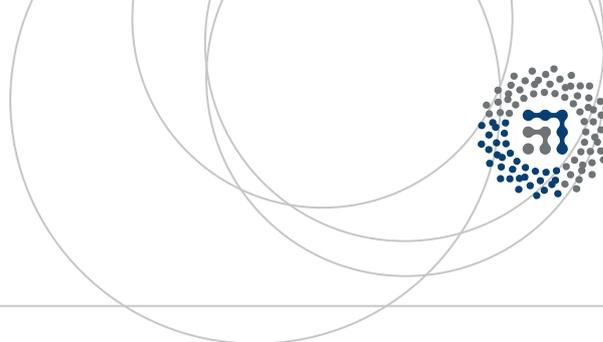


eman ta zabal zazu



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

Estudio de la unión de la calmodulina al canal de potasio Eag I y el efecto de esta unión en la tetramerización del canal

Autor:

Juncal Aldareguia Fernandez

Directora:

Dra. Pilar Areso

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	2
Canal Eag I	2
Estructura.....	2
N-terminal: dominio de unión a la calmodulina (CBD) y dominio PAS	2
C-terminal: dominio de unión a cNMPs (NBD), CBD y dominio de tetramerización (TD)	3
Inhibición del canal Eag I mediante Ca ²⁺ -CaM	4
Eag I y Kv7	4
OBJETIVOS.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Técnicas de biología molecular	5
PCR sencilla	5
Etiquetar fluoróforos en la región N-terminal.....	5
Técnicas de experimentación con células de mamífero.....	6
Mantenimiento de la línea celular HEK293T	6
Siembra de células para microscopía	7
Método de transfección.....	7
Estudios por microscopía confocal.....	7
FRET (Förster Resonance Energy Transfer)	7
Obtención y tratamiento de datos	8
RESULTADOS.....	9
PCRs	9
Digestiones.....	100
Estudios de FRET	111
Interacción del canal Eag I con la CaM.....	11
Efecto de la unión de CaM en la tetramerización del canal Eag I.....	112
Colocalización de CaM en presencia del canal Eag I.....	122
DISCUSIÓN	133
Unión de la CaM al extremo C-terminal del canal Eag I.....	13
Efecto de la unión de CaM en la tetramerización del canal Eag I.....	13
BIBLIOGRAFÍA.....	155

INTRODUCCIÓN

Canal Eag I

Los canales Eag I son miembros de la familia de los canales de potasio *ether-à-go-go* o KCNH, que son selectivos al potasio, dependientes de voltaje, no se inactivan y están implicados en el control de la excitabilidad celular. Estos canales se expresan prácticamente en todas las regiones del cerebro adulto (Gutman G.A., 2005). Son proteínas transmembranales que permiten el paso del ion potasio (K^+) a través de la membrana plasmática de manera selectiva, siguiendo el gradiente electroquímico. Sufren cambios conformacionales impulsados por cambios del gradiente de voltaje a través de la membrana. Dichos cambios aumentan la probabilidad de apertura del canal cuando la membrana se encuentra cerca del potencial de reposo y entonces el K^+ intracelular sale hacia el exterior, hiperpolarizando la célula. Así se eleva el umbral para generar nuevos potenciales y se disminuye la capacidad de la célula para responder a estímulos. Por esta razón los canales Eag I controlan la excitabilidad celular.

Los canales iónicos suelen estar implicados en diferentes enfermedades denominadas canalopatías, y entre ellas se encuentra el cáncer. Los Eag I son unos de los canales implicados en el crecimiento tumoral, ya que su inhibición disminuye la proliferación de los tumores y su expresión es muy elevada en estos tejidos (Pardo L.A. y Stühmer W., 2014). Los factores que promueven la mitosis afectan a las corrientes que pasan por estos canales. Estos factores y la despolimerización de los microtúbulos modulan la afinidad del canal por diferentes iones, dejando pasar otros iones además del K^+ , a través del canal (Urrego D. et al., 2014). En conclusión, los Eag I son unos marcadores tumorales importantes y su estudio puede ser interesante por su potencial como diana terapéutica y como diagnóstico.

Estructura

Los canales Eag I están compuestos por la asociación de cuatro subunidades, formando de esta manera tetrámeros. Estas subunidades están compuestas por 6 segmentos transmembrana (S1-S6) hidrofóbicos en configuración de hélice- α . Los cuatro primeros segmentos (S1-S4) constituyen el dominio sensor de voltaje. Entre los segmentos S5 y S6 hay un lazo que forma el poro del canal. También consta de dos segmentos terminales muy extensos, los extremos N- y C-terminales, que se encuentran en el interior celular y presentan estructuras multimodulares (Morais Cabral J.H. et al., 1998). Estos dos extremos tienen un papel crucial en la regulación de la apertura y cierre del canal, en el ensamblaje y el tráfico del canal a la membrana y en la interacción con proteínas señalizadoras como la calmodulina.

N-terminal: dominio de unión a la calmodulina (CBD) y dominio PAS

En el N-terminal se encuentran dos dominios importantes. En primer lugar hay un dominio de unión a la calmodulina (CBD-N) (Ziechner U. et al., 2006). La calmodulina (CaM) es una proteína expresada en células eucariotas que une Ca^{2+} . Consta de dos dominios homólogos formados por dos conformaciones hélice-lazo-hélice, denominados manos EF, que forman los sitios de unión al Ca^{2+} . Esta

pequeña proteína se une a una gran variedad de dianas y es capaz de modular su acción (Villarroel et al., 2014).

El otro dominio, el dominio PAS, es una secuencia altamente conservada en diferentes canales de potasio. Parece estar implicado en la regulación de la apertura y cierre del canal mediante interacciones con el lazo que se encuentra entre los segmentos transmembrana S4 y S5 (Morais Cabral J.H. et al., 1998).

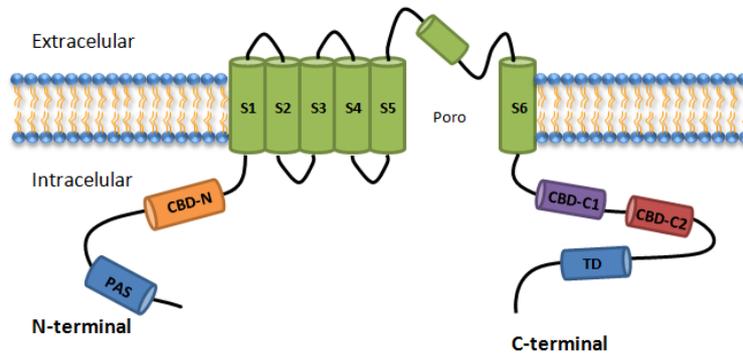


Fig 1. Esquema de una subunidad del canal Eag I. Dominios C- y N-terminales intracelulares con los dominios reguladores, 6 hélices transmembranales y el poro.

C-terminal: dominio de unión a cNMPs (NBD), CBD y dominio de tetramerización (TD)

El extremo C-terminal contiene cuatro dominios reguladores. El primero es el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (NBD) que comparten todos los canales de la familia *ether-à-go-go*, aunque estudios realizados demuestran que en Eag I no es funcional, ya que el cAMP o el cGMP no se unen o no regulan la apertura o cierre del canal (Brelidze T.I. et al., 2009).

Además, el canal consta de otros dos dominios de unión a la CaM en el C-terminal (CBD-C1 y CBD-C2) (Ziechner U. et al., 2006). El CBD-C1 no es capaz de unir CaM, aunque sí que podría contribuir de una manera cooperativa en la unión de CaM al CBD-C2. En cambio, el dominio del N-terminal (CBD-N) sí que es capaz de unir CaM, al parecer con más afinidad que el CBD-C2 (Gonçalves J.T. y Stühmer W., 2010).

El canal contiene motivos de trenzas-trenzadas (*coiled-coils*) en el extremo C-terminal. Estos motivos forman el dominio de tetramerización, implicado en interacciones entre proteínas. La secuencia sigue un patrón de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que se repite cada 7 residuos, en el que las posiciones 1 y 4 están ocupadas preferentemente por residuos hidrofóbicos (Lupas A., 1996). La naturaleza anfipática de estas estructuras conduce a la multimerización del canal. Varios estudios muestran que este dominio es esencial para el funcionamiento correcto de varios canales de la familia KCNH (Erg), aunque esto todavía no se ha descrito para el Eag I (Jenke M. et al., 2003).

Inhibición del canal Eag I mediante Ca²⁺-CaM

El canal Eag I es inhibido casi completamente por Ca²⁺ cuando este ion se encuentra en concentraciones superiores a 150 nM en el interior celular (Standfeld C.E. et al., 1996). Cuando el Ca²⁺

se une a la CaM, ésta interacciona con los dominios tanto del N- como del C-terminal del canal, inhibiéndolo. Estudios realizados por mutagénesis en los dominios CBD muestran una disminución de la inhibición mediada por la Ca^{2+} -CaM. Lo que todavía está por resolver es el mecanismo de inhibición, ya que se carece de información estructural del canal unido a la CaM (Ziechner U. et al., 2006).

Aunque cada subunidad del canal conste de tres CBD, la unión de la Ca^{2+} -CaM a los dominios CBD-N y CBD-C2 es suficiente para inhibir el canal (Gonçalves J.T. y Stühmer W., 2010). La gran sensibilidad por las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, unido a la activación cerca del potencial de reposo y a la ausencia de inactivación, hace que estos canales de potasio sean buenos candidatos para regular rápidamente la excitabilidad de la membrana cuando se dan cambios de concentración de Ca^{2+} intracelular (Standfeld C.E. et al., 1996).

Eag I y Kv7

Los canales Eag I tienen una gran similitud tanto estructural como funcional con los canales KCNQ, otra familia de canales de potasio. Desde el punto de vista estructural, los dos tienen un extremo C-terminal muy parecido, ya que los dos constan de al menos de un dominio de unión a CaM y un dominio de tetramerización, formado por el motivo de hélices-trenzadas. En cuanto a la función, los dos canales regulan la excitabilidad celular, permitiendo corrientes de potasio que pasan a través de ellos, reduciendo así la capacidad de la célula de crear un potencial de acción. Los KCNQ también se inhiben por la interacción con la CaM (Gamper and Shapiro, 2003).

Estudios realizados en el laboratorio han demostrado que estos canales interaccionan con la CaM y que ésta ayuda a la tetramerización del canal. Para explorar si se trata de un fenómeno general, y basándonos en la gran similitud de los dos canales, el objetivo de este trabajo es ver cómo afecta la unión de la CaM en la tetramerización del canal Eag I. Para esto se utilizarán técnicas de fluorescencia por transferencia de energía (FRET). Aunque cada subunidad del canal consta de tres dominios de unión a CaM, en este estudio sólo se estudiará el CBD-C2.

OBJETIVOS

- Conseguir los clonajes, etiquetando el C-terminal con proteínas fluorescentes.
- Expresar las proteínas en las células HEK293T.
- Mediante experimentos de FRET, ver el efecto que tiene la unión de la CaM en la tetramerización del canal Eag I y ver en qué condiciones, con o sin el dominio de tetramerización, se une la CaM al canal Eag I.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas de biología molecular

PCR sencilla

Los oligonucleótidos se diseñan incorporando nuevos sitios de restricción, y se mandan sintetizar por la compañía IDT Conda. Para realizar las PCRs se utilizan las polimerasas Expand High Fidelity (03300242001, Roche), Pfu (600250, Stratagene) y Taq (EP0701, Thermo Scientific). Todos los fragmentos de PCR se introducen en el vector pGEM-EasyT (23893002, Promega), que está abierto y presenta dos timidinas en sus extremos terminales 3' para facilitar la ligación de productos de PCR. Además, el producto de PCR se inserta flanqueado por los promotores de las ARN polimerasas T7 y SP6, que se utilizarán para secuenciar.

Tabla 1. Reacción y protocolo de PCR.

DNA	H ₂ O	Primers	Buffer Expand (con DMSO y dNTPs)	Polimerasa (Expand)
[0,1 µg/µl] 0,4 µl	15,1 µl	[0,5 µg/µl] 0,2 µl x 2	[2,5 mM] 4 µl	0,3 µl

Ciclos:

- Temperatura de inicio: 94°C
 - Separación de las hebras de DNA: 95°C, 20 s
 - Hibridación de los oligonucleótidos: 55°C, 30 s
 - Amplificación por la polimerasa: 72°C, 1 min
- } x 21

Etiquetar fluoróforos en la región N-terminal

Etiquetas y fluoróforos: Para los experimentos de FRET se utilizan las proteínas fluorescentes YFPm con la mutación A206K (Ab: 514 nm; Em: 525-530 nm), CFPm con la mutación L221K (Ab: 438 nm; Em: 450 nm) y Turquoise2 (Ab: 438 nm; Em: 450 nm).

Vectores de expresión: Todas las construcciones se expresan en el vector pcDNA3.1 His/Myc C.

Digestión de fragmentos, purificación y ligación: Los ADNs (en Easy-T) se digieren durante 2 horas a 37°C con las enzimas de restricción adecuadas. Después, se neutraliza la reacción con el tampón de carga 10x (50 % glicerol, 0,2 M EDTA pH 8, 0,05 % azul bromofenol) y se separa el vector del fragmento mediante 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). Como referencia de tamaño se utiliza el marcador de ADN fago lambda digerido con BstEII (SD0011, Fermentas). Los geles de agarosa llevan bromuro de etidio. 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 (Ref: EL0014, Fermentas) a temperatura ambiente O/N.

Tabla 2. Protocolo de digestión.

DNA	H ₂ O	Buffer [10X]	Enzima
Vector [1 µg/µl] 1 µl	16 µl	2 µl	2x 0,5 µl
Fragmento [1 µg/µl] 2 µl	15 µl	2 µl	2x 0,5 µl

Tabla 3. Protocolo de ligación.

Fragmento de ADN	Vector	Buffer de Ligasa [10X]	Ligasa T4
[1 µg/µl] 7,5 µl	[1 µg/µl] 1 µl	[1 µg/µl] 1 µl	0,5 µl

Transformación en bacterias *E. coli*: Las ligaciones se transforman en la cepa bacteriana *E. coli* BSL competentes mediante transformación química (Buffer de transformación TB 2x: 40 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂). Las bacterias se siembran en placas de LB con antibiótico (soluciones 1000x: Ampicilina 100 mg/ml) y se incuban a 37°C hasta que aparecen colonias.

Extracción y cuantificación de ADN: Para realizar minipreps, cada colonia se pica de la placa a un tubo ventilado que contiene 3 ml de LB/antibiótico (1:1000) y se deja crecer en agitación O/N a 37°C. Se cogen 2 ml de cultivo y se procede al siguiente protocolo: (1) dar un *spin* al máximo; (2) resuspender el *pellet* en TE 1X (TE 10X: 100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA); (3) lisis alcalina de la suspensión de bacterias (0,2 M NaOH/ 1 % SDS); (4) neutralización (3 M acetato potásico, 5 M ac. acético); (5) separación de proteínas de lípidos mediante 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 obtiene una concentración de ADN de, aproximadamente, 1-2 µg/µl.

Técnicas de experimentación con células de mamífero

Mantenimiento de la línea celular HEK293T

La línea celular HEK293T crece en monocapa y es adherente. Su tiempo generacional es de 20-24 horas y posee el origen de replicación del SV40 (pcDNA3.1). Una vez transfectadas se generan nuevas copias del plásmido y en consecuencia aumenta la producción de proteína. La línea celular se mantiene en medio DMEM (D6429, Sigma), suplementado con aminoácidos no esenciales (M7145, Sigma) y un 10 % de suero fetal bovino (FBS, Lonza) en incubadores a 37°C, 5 % CO₂, O₂ atmosférico y humedad relativa del 95 %. Cuando las células alcanzan el 80-90 % de confluencia, se realiza un lavado de la monocapa con tampón de disociación (13151, Gibco Invitrogen). Después se levantan y disgregan las células con 3

mL de una mezcla de Tripsina-EDTA (25300, Gibco Invitrogen) y tampón de disociación (razón 1:2). Se resiembr a la dilución deseada en el medio DMEM.

Siembra de células para microscopía

(1) Según el número de grupos, por cada placa Petri de 35 mm se coloca un cubre de 25 mm de diámetro; (2) éste se trata con poli-L-lisina (P1524-100, Sigma-Aldrich) y se deja incubar 15 min en luz UV para esterilizar la placa y tratar el cubre; (3) se recicla la poli-L-lisina y se lava cada placa 3 veces con 2 mL PBS por pocillo; (4) se añaden células previamente levantadas con una mezcla de 1,5 mL tripsina/buffer de disociación (1:2) y también medio según su confluencia hasta llegar a 2 mL de volumen.

Método de transfección

Los ADNs utilizados para transfectar las células se extraen mediante midipreps a partir de 100 ml de cultivo (Genopure Plasmid Midi Kit, 3143414, Roche). El ADN se cuantifica en el NanoDrop 2000.

En estos trabajos se ha utilizado el método de transfección mediante polietilenimina (PEI, Ref: 23966-2, PolySciences 2gr). Se utilizan placas de 35 mm. En un tubo se prepara una mezcla con 4,8 ul de PEI por μg de ADN a transfectar y se lleva hasta 50 μL con NaCl 150 mM y se incuba a temperatura ambiente 15 min. De mientras, en otro tubo, se prepara el ADN a transfectar con NaCl 150 mM hasta 50 μL . Una vez pasados los 15 min, se mezcla el contenido de los dos tubos, se le da un bortex bajo y se deja incubando 30 min. Después se aspira el medio y se pone 1 mL de medio fresco con gentamicina (1:1000) y finalmente se añade la mezcla de PEI y ADN. Al cabo de 6 horas de incubación se cambia el medio de las células (2 mL de medio nuevo con antibiótico).

Estudios por microscopía confocal

Las células se transfectan 48 horas antes del experimento con las proteínas fusión. La adquisición de imágenes se realiza con en el equipo Nikon TE2000-U (Nikon, Melville, NY, USA) con un detector espectral Nikon D-eclipse CI Si y el programa informático EZ C1 3.80 software (Nikon). Los experimentos se realizan con el objetivo x60 de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1,45. Las imágenes se capturan con el pinhole abierto, lo que se corresponde con un diámetro de 150 μm . En este equipo se toman 32 imágenes simultáneas a distintas longitudes de onda de emisión entre 450 y 610 nm, con intervalos de 5 nm, cada fotomultiplicador detecta un intervalo y a partir de ahí se construye una imagen combinando la emisión captada en todos los fotomultiplicadores.

FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

Es un fenómeno de transferencia de energía entre dos fluoróforos descrito por primera vez en 1946 por Theodor Förster. Esta transferencia está determinada por 3 condiciones: (1) la distancia entre los fluoroforos tiene que ser menor de 100 nm; (2) la orientación de los dipolos tiene que ser adecuada

y (3) el solapamiento espectral entre la emisión del donador y la absorción del aceptor. Si todo se cumple, al excitar el donante (CFPm), se obtendrá señal no sólo azul sino también del aceptor (YFPm).

Obtención y tratamiento de datos

Obtención de datos: Primero se excita la muestra con el láser de 408 nm (láser al 100 %) y después con el de 488 nm (láser al 10 %). Para obtener una imagen se hace una media de 20 fotografías, de modo que la relación señal:ruido aumenta de manera considerable. Se emplea el programa EZ C1 3.80.

Tratamiento de datos: Las imágenes tomadas necesitan un procesamiento, el unmixing o separación de espectros para aislar la señal correspondiente a cada fluoróforo. Después cada imagen se analiza con el software ImageJ (Versión WCIF, National Institutes of Health, USA). Se escoge un área de cada célula que presente una distribución homogénea de la fluorescencia y se mide la intensidad de cada canal.

Cálculos de FRET: En cada campo se selecciona un área del fondo para después restar éste valor a la medida de intensidad de cada célula. Después se hace una corrección en la que se elimina la emisión de amarillo que se produce por excitación directa de YFPm a 408 nm. Basándose en experimentos anteriores del laboratorio, se calcula la proporción de emisión de YFPm excitada a 408 nm comparada con la emisión de YFP nm excitada a 488nm. Para esto se resta al valor de amarillo obtenido a 408 nm el 3.1 % de amarillo a 488 nm.

La relación de FRET es la división de la señal de amarillo obtenida indirectamente mediante FRET al excitar a 408 nm dividida por la señal de azul. Cuanta mayor sea la relación más transferencia de energía ocurre entre ambos grupos de moléculas, por lo que se deduce que la interacción entre ambas es más probable.

RESULTADOS

Primero se contruyeron los diferentes clonajes que luego serían utilizados para los experimentos de FRET:

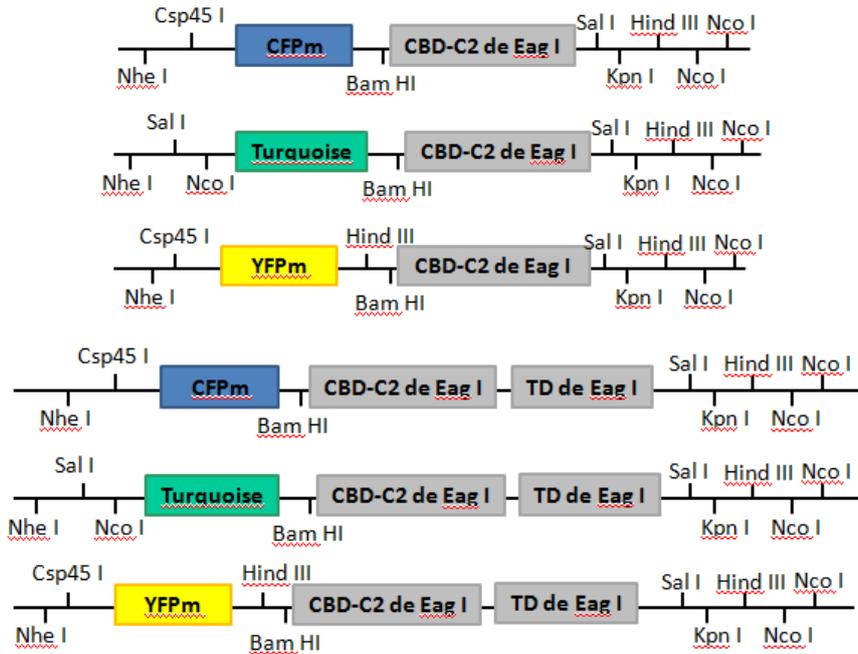


Fig 2. Clonajes. Contienen las proteínas fluorescentes (CFPm, Turquoise y YFPm) y el dominio de unión a la calmodulina del C-terminal (CBD-C2) o el CBD-C2 y el dominio de tetramerización (TD). Están indicados también los puntos de corte de diferentes enzimas de restricción.

PCRs

Para conseguir los clonajes (Fig 2.), primero se hizo una PCR para amplificar los fragmentos del DNA del canal (proporcionado por Pardo L.A.). Se amplificaron, por una parte, sólo el dominio de unión a la calmodulina (CBD) y, por otra parte, CBD y el dominio de tetramerización (TD). Cada fragmento es de 750 y 950 pb respectivamente, con lo que en el gel de agarosa se deberían ver las bandas correspondientes a dichos tamaños. Debido a problemas con las PCR, se realizaron con diferentes enzimas y en diferentes condiciones (Fig 3.).

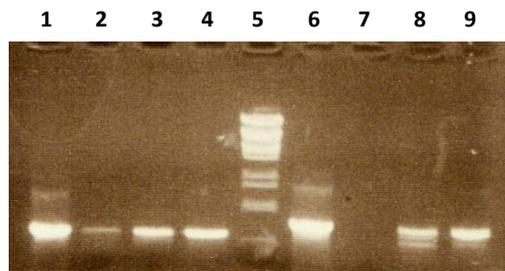


Fig 3. Gel de agarosa con los productos de las PCR. 1) amplificado de CBD (750 pb) con la enzima Expand y sin DMSO. 2) amplificado de CBD con Expand y DMSO. 3) amplificado de CBD con la enzima Pfu y sin DMSO. 4) amplificado de CBD con Pfu y DMSO. 5) marcador λ . 6) amplificado de CBD+TD (950 pb) con Expand y sin DMSO. 7) amplificado de CBD+TD con Expand y DMSO. 8) amplificado de CBD+TD con Pfu y sin DMSO. 9) amplificado de CBD+TD con Pfu y DMSO.

En el gel (Fig 3.) se ve que todas las PCRs (excepto la calle 7) se han amplificado y muestran el tamaño correcto.

Después, se puso a ligar el producto de PCR conseguido (con Expand y sin DMSO, Fig 3. calles 1 y 6) con el vector Easy-T O/N. Se transformaron las bacterias *E. coli* con el ligado y se chequearon los ADNs con la enzima EcoR I, que corta a los dos lados del inserto, dando de esta manera dos bandas, la del inserto de interés y la del Easy-T.

Digestiones

Se eligieron los ADNs que dieron positivo en el chequeo, los que contenían el inserto, y se digirieron con las enzimas BamH I y Kpn I, con las que se prepararía el inserto de interés para ligarlo con los vectores que contenían las proteínas fluorescentes (CFPm, YFPm y Turquoise). Una vez digerido, se purificó la banda del inserto, que contenía el CBD y CBD-TD (Fig 4.). Los vectores que contienen las proteínas fluorescentes estaban previamente digeridos con las mismas enzimas, con lo que se pusieron a ligar con el producto de la purificación de las bandas.

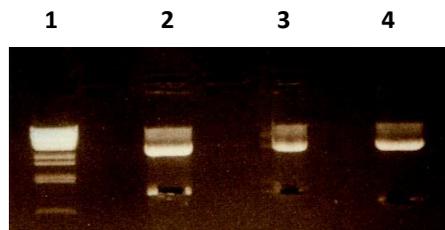


Fig 4. Gel de agarosa con las digestiones de Easy-T. 1) marcador λ . 2 y 3) digestión con BamH I y Kpn I y purificación de la banda que contiene el CBD+TD (950 pb). 4) digestión con BamH I y Kpn I y purificación de la banda que contiene el CBD (750 pb).

Una vez dejado a ligar los vectores con los fragmento O/N, se chequearon las ligaciones con los enzimas Hind III y Sal I (Fig 5.). Los clonajes que contienen la YFPm y la CFPm se chequearon con Hind III, que corta después de la proteína fluorescente y después de CBD o de TD (Fig 2.), dando así unos fragmentos de 750 pb y 950 pb aproximadamente. Los clonajes con Turquoise se chequearon con Sal I, que corta antes de la proteína fluorescente y después de CBD y TD (Fig 2.), dando así unos fragmentos de 1450 pb y 1650 pb aproximadamente.

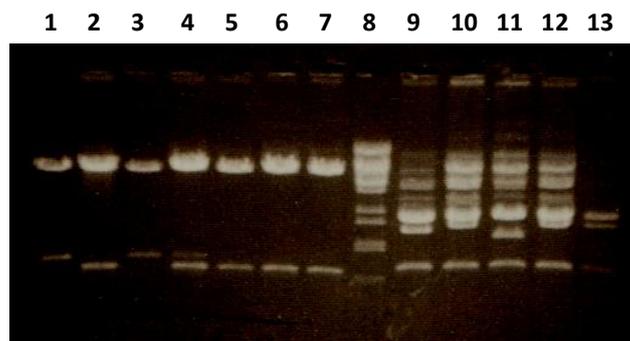


Fig 5. Gel de agarosa con los chequeos. 1) digestión de CFPm-CBD-TD. 2) digestión de CFPm-CBD. 3) digestión de YFPm-CBD-TD. 4, 5, 6 y 7) digestión de YFPm-CBD. 8) marcador λ . 9) digestión de Turquoise-CBD. 10, 11, 12 y 13) digestión de Turquoise-CBD-TD.

Los resultados muestran que los clonajes están contruidos adecuadamente, ya que en todas las calles están las bandas esperadas (excepto en la calle 11, que aparece una banda de un tamaño más pequeño).

Estudios de FRET

Por último, se cotransfectaron las células con diferentes construcciones (todas insertadas en el vector pcDNA3.1 His-Myc C) para después realizar estudios de FRET con estas células. Se hicieron diferentes grupos:

1. CFPm-Eag I CBD + YFPm-CaM
2. CFPm-Eag I CBD-TD + YFPm-CaM
3. CFPm-Eag I CBD-TD + YFPm-Eag I CBD-TD
4. CFPm-Eag I CBD-TD + YFPm-Eag I CBD-TD + CaM
5. CFPm-Eag I CBD + YFPm-Eag I CBD
6. CFPm-Eag I CBD + YFPm-Eag I CBD + CaM

En todos los grupos la expresión de las proteínas no fue adecuada, ya que la proteína no tenía una localización homogénea en las células y las células no presentaban una morfología apropiada. Aun así, se cuantificó el nivel de fluorescencia de las células, seleccionando las áreas donde la proteína se encontraba repartida más homogéneamente.

Unión de la CaM al extremo C-terminal del canal Eag I

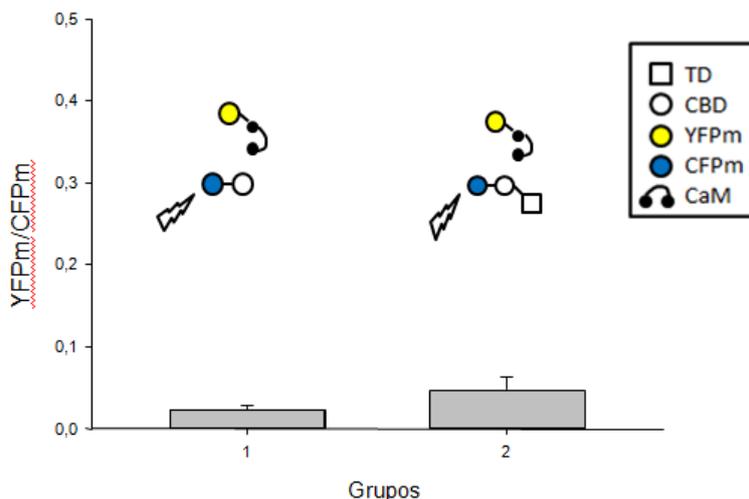


Fig 6. Ratio YFPm/GFPm de los diferentes grupos excitados a 408 nm. 1) CFPm-CBD + YFPm-CaM 2) CFPm-CBD-TD + YFPm-CaM.

En los dos primeros grupos el objetivo era ver la unión de la CaM al canal. En estos grupos la relación de entre los dos fluoróforos es aproximadamente nula. Esto muestra que la YFP-CaM no adopta la configuración para generar FRET, ya porque no se una al C-terminal de Eag I, o porque la orientación de los fluoróforos una vez se forma el complejo no es adecuada, ni en ausencia ni presencia de TD (Fig 6.1 y 6.2).

Efecto de la unión de CaM en la tetramerización del canal Eag I

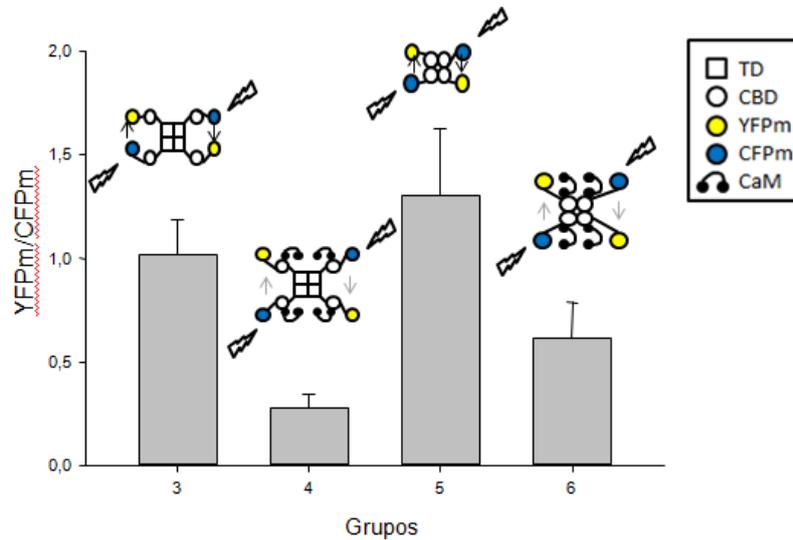


Fig 7. Ratio YFPm/GFPm de los diferentes grupos excitados a 408 nm. 3) CFPm-CBD-TD + YFPm-CBD-TD 4) CFPm-CBD-TD + YFPm-CBD-TD + CaM 5) CFPm-CBD + YFPm-CBD 6) CFPm-CBD + YFPm-CBD + CaM. Las flechas indican la transferencia de energía.

En los últimos cuatro grupos el objetivo era ver si el canal tetramerizaba y qué efecto tenía la CaM en esta tetramerización. En estos grupos, la relación YFPm/GFPm no es nula, con lo que se puede decir que existe una interacción entre las subunidades del canal. Esta interacción es más evidente entre las subunidades que carecen de TD (Fig 7.3 y 7.5). Además, en los grupos 4 y 6 disminuye la relación YFPm/CFPm respecto a los grupos 3 y 5 (Fig 7.3, 7.4, 7.5 y 7.6). Esto quiere decir, de no existir ningún problema técnico, que la CaM impide o dificulta la interacción entre las subunidades del canal.

Colocalización de CaM en presencia del canal Eag I

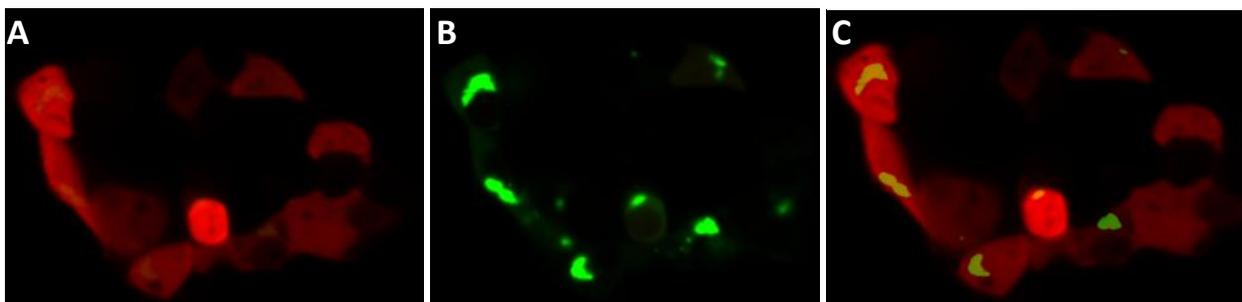


Fig 8. Imágenes de microscopía confocal. Emisión de células cotransfectadas con CFPm-CBD-TD + YFPm-CaM A) Excitación a 408 nm. Emisión de CFPm. B) Excitación a 488 nm. Emisión de YFPm. C) Imagen superpuesta de la emisión de CFPm y YFPm. Las regiones en amarillo se corresponden a la emisión de los dos fluoróforos.

Las imágenes del microscopio de los dos primeros grupos muestran que hay una colocalización intracelular de la CaM cuando se cotransfecta con el canal, ya que la YFP-CaM sólo se encuentra en algunas regiones de la célula (Fig 8.C), que podrían corresponderse con el aparato de Golgi. Este fenómeno es más evidente en el caso en el que el canal contiene el dominio de tetramerización. Esta colocalización sugiere que la CaM interacciona con el canal, ya que en estudios anteriores del

laboratorio en los que se utilizó la misma construcción de YFPm-CaM mostraba una expresión homogénea en toda la superficie celular. En otras palabras, el cambio de la distribución intracelular solo se observa en presencia del CBD de Eag I.

DISCUSIÓN

Los objetivos principales de este trabajo eran ver si la CaM interaccionaba con el C-terminal del canal y observar el efecto que producía la calmodulina en la tetramerización del canal. Por esta razón se estudiaron los canales con y sin el dominio de tetramerización y en condiciones normales o elevando los niveles de calmodulina.

Unión de la CaM al extremo C-terminal del canal Eag I

Los resultados obtenidos mediante la cuantificación de fluorescencia de las células muestran relaciones YFPm/CFPm aproximadamente nulas, sugiriendo que la CaM no se une al canal ni en ausencia ni en presencia del dominio de tetramerización (Fig 6.1 y 6.2). Esto no se corresponde con los resultados obtenidos en el laboratorio con los canales Kv7, en los que se demuestra que la CaM es capaz de unir el C-terminal de éstos con y sin el dominio de tetramerización. Estudios realizados por otros grupos muestran que sí hay interacción entre la CaM y Eag I (Gonçalves J.T. y Stühmer W., 2010). También sabemos que la CaM inhibe el canal cuando está unida a Ca^{2+} (Ziechner U. et al., 2006). Además, la presencia del canal hace que la localización celular de la CaM varíe y adopte una localización que podría corresponderse a Golgi (Fig 8.B y 8.C) sugiriendo una interacción entre las dos proteínas. En otros experimentos del laboratorio la misma construcción de CaM etiquetada siempre ha mostrado una expresión homogénea en toda la superficie celular. Esto quiere decir que la presencia del C-terminal del canal afecta de alguna manera a la localización de la CaM, lo que requiere de una interacción entre las dos proteínas, que podría ser indirecta, explicando así la falta de transferencia entre los dos fluoróforos. Además, existen otras razones, tales como orientación inadecuada o distancia excesiva de los fluoróforos, por las que FRET no se manifiesta aunque se forme el complejo. Para comprobar esto habría que etiquetar la CaM en el otro extremo y ver si de esta manera se consigue la transferencia de energía entre los dos fluoróforos.

Como se ha mencionado anteriormente, para que la CaM interaccione con el C-terminal del canal es necesario que ésta esté unida a Ca^{2+} . Al no haber elevado la concentración de Ca^{2+} intracelular, asumimos que la calmodulina sobreexpresada no se hallaba calcificada y por ello no estaba disponible para unirse al C-terminal del canal Eag I de manera adecuada. Para comprobar si es la falta de Ca^{2+} lo que impide o dificulta la interacción, habría que elevar los niveles de Ca^{2+} y observar si en estas condiciones se da el fenómeno de FRET.

Efecto de la unión de CaM en la tetramerización del canal Eag I

En los datos se observa una disminución de la relación YFPm/CFPm en la interacción entre subunidades del canal tanto en presencia del dominio de tetramerización como sin él cuando se

sobreexpresa CaM (Fig 7.3, 7.4, 7.5 y 7.6). No hay ningún estudio anterior que demuestre lo contrario, pero sabemos que en los canales Kv7 cuando se sobreexpresa CaM aumenta la relación YFPm/CFPm, sugiriendo una mayor interacción entre las subunidades del canal. Basándonos en estos resultados y teniendo en cuenta la similitud que tienen con los Eag I, los resultados de este trabajo no eran los esperados.

Hay que tener en cuenta que había una expresión excesiva del dominio del canal etiquetado con YFPm en los últimos cuatro grupos. Esto puede hacer que la relación YFPm/CFPm obtenida se dé por excitación directa de YFPm a 408 nm y no porque ha habido una transferencia de energía entre los fluoróforos. Con lo que no se puede asegurar que las relaciones YFPm/CFPm más altas (Fig 7.3 y 7.5) se correspondan con interacciones reales entre las subunidades del canal.

Por último, hay que mencionar que la expresión del dominio del canal y de la CaM en la célula no fueron óptimas, ya que la fluorescencia en las células no era homogénea, y que la morfología de las células en todos los casos presentaba aberraciones. Esto muestra que no estaban en un estado metabólico normal, y puede que las interacciones entre proteínas no fueran las que sucederían en un estado saludable de las células. Todos estos problemas hacen que los resultados obtenidos puedan no ser representativos de lo que ocurre en células con niveles de expresión moderados.

Para conseguir unos resultados más fiables habría que hacer algunas correcciones al trabajo realizado hasta ahora. Habría que optimizar la transfección, disminuyendo la cantidad de ADN transfectado a las células para reducir los niveles de expresión, y ver si así el estado de las células es más compatible con morfologías celulares típicas. Para esto habría que hacer algunas pruebas hasta conseguir las concentraciones de ADN a transfectar con las que los dos fluoróforos se expresen a concentraciones similares y que las células muestren una morfología normal. Una vez conseguido esto, habría que volver a repetir los estudios realizados hasta ahora, probando también a elevar las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares para ayudar a la interacción de la CaM con el canal.

BIBLIOGRAFÍA

- Brelidze T.I., Carlson A.E. and Zagotta W.N. (2009). Absence of Direct Cyclic Nucleotide Modulation of mEAG1 and hERG1 Channels Revealed with Fluorescence and Electrophysiological Methods. *J. Biol. Chem*, Vol. 284, No. 41.
- Gonçalves J.T. and Stühmer W. (2010). Calmodulin Interaction with hEAG1 Visualized by FRET Microscopy. *PLoS ONE*, Vol. 5, Issue. 5.
- Gutman G.A., Chandy K.G., Grissmer S., Lazdunski M., Mckinnon D., Pardo L.A., Robertson G.A., Rudy B., Sanguinetti M.C., Stühmer W. and Wang X. (2006). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.*, 57:473-508.
- Jenke M., Sánchez A., Monje F., Stühmer W., Weseloh R.M. and Pardo L.A. (2003). C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels. *EMBO J.*, Vol. 22, No. 3.
- Lupas A. Coiled coils: new structure and new functions. (1996). *TIBS*-21.
- Morais Cabral J.H., Lee A., Cohen S.L., Chait B.T., Li M. and Mackinnon R. (1998). Crystal Structure and Functional Analysis of the HERG Potassium Channel N Terminus: A Eukaryotic PAS Domain. *Cell*, Vol. 95, 649-655.
- Pardo L.A. and Stühmer W. (2014). The roles of K⁺ channels in cancer. *Nature Reviews*, Vol. 14.
- Stansfeld C.E., Röper J., Lidwig J., Weseloh R.M., Marsh S.J., Brown D.A. and Pongs O. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 93, 9910-9914.
- Urrego D., Tomczak A.P., Zahed F., Stühmer W. and Pardo L.A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Phil. Trans. R. Soc, B* 369: 20130094.
- Villarroel A., Tagliatalata M., Bernardo-Seisededos G., Alaimo A., Agirre J., Alberdi A., Gomis-Perez C., Soldovieri M.V., Ambrosino P., Malo C. and Pilar Areso. (2014). The Ever Changing Moods of Calmodulin: How Structural Plasticity Entails Transductional Adaptability. *J. Mol. Biol.*, 426, 2717–273.
- Ziechner U., Schönherr R., Born A.K., Gavrilova-Ruch O., Glaser R.W., Malesevic M., Küllertz G. and Heinemann S.H. (2006). *FEBS J.*, Vol 273.