



Trabajo Fin de Grado  
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

# Estudio de la interacción entre los canales Kv7.2 y la calmodulina utilizando la técnica Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)

Autor:

Nerea Lazcanoiturburu Ferreira

Directora:

Dra. Maria Pilar Areso Goiricelaya

Co-director:

Dr. Alessandro Alaimo

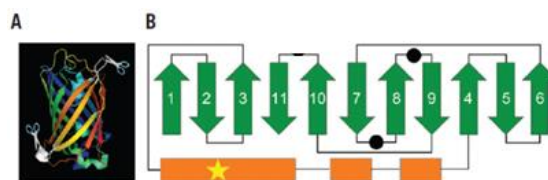
# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivos .....	2
MATERIALES Y MÉTODOS .....	3
Métodos de biología molecular .....	3
PCR Quick Change .....	3
Fusión de la región N-terminal de la Venus a la CaM y de la región C-terminal de la Venus al canal Kv7.2 .....	3
Fragmentos y vectores de expresión .....	3
Digestión de fragmentos y vectores, purificación y ligación .....	4
Transformación en bacterias <i>E.coli</i> .....	4
Extracción y cuantificación de ADN .....	5
Obtención de un elevado número de copias de ADN plasmídico (midipreps) .....	5
Técnicas de experimentación con células de mamífero .....	6
Mantenimiento de la línea celular HEK293T, levantamiento y siembra de células .....	6
Método de transfección .....	6
Re-siembra de células .....	7
Estudios por microscopía confocal.....	7
RESULTADOS .....	7
PCR Quick Change .....	8
Digestiones y chequeos .....	8
Chequeos midipreps .....	9
Estudios BiFC .....	9
DISCUSIÓN .....	12
CONCLUSIONES .....	12
BIBLIOGRAFÍA.....	13

## 1. INTRODUCCIÓN

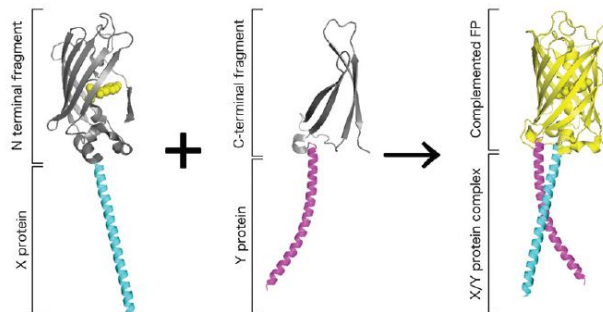
La técnica denominada Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) es utilizada para visualizar directamente las interacciones proteína-proteína implicadas en numerosos procesos biológicos tanto en células vivas como en organismos (Kodama y Hu, 2010). Entre las desventajas que presentan muchos de los métodos (FRET, BRET, Y2H, etc.) que permiten la visualización directa de las interacciones proteína-proteína se encuentra la eliminación de las proteínas de su entorno natural, así como una instrumentación elaborada y un procesamiento de datos complejo. No obstante, la visualización de dichas interacciones en células vivas proporciona el potencial para llevar a cabo la detección perturbando mínimamente su entorno natural (Kerppola, 2006; Kerppola, 2008).

El ensayo BiFC se basa en la complementación estructural entre dos fragmentos no fluorescentes N-terminal y C-terminal de una proteína fluorescente (Kodama y Hu, 2012). Estas proteínas, análogas de la proteína fluorescente verde (GFP), constan de 11 hojas  $\beta$  antiparalelas que forman un barril  $\beta$  en el centro del cual se encuentra una hélice  $\alpha$  y varias estructuras helicoidales cortas (Yang *et al.*, 1996) (**Figura 1, A y B**). El cromóforo se encuentra dentro de la hélice  $\alpha$  y está formado químicamente por tres residuos (Tsien, 1998) (**Figura 1 B**).



**Figura 1: Estructura de las proteínas fluorescentes empleadas en la técnica BiFC.** (A) Estructura tridimensional de la proteína fluorescente amarilla denominada Venus (PDB ID: 1MYW). (B) Topología plegada de una proteína fluorescente. Las flechas numeradas en color verde representan las hojas  $\beta$  y las cajas de color naranja representan las hélices  $\alpha$ . Los círculos representan los sitios de corte y el símbolo de la estrella representa el fluoróforo (Kodama y Hu, 2012).

Los dos fragmentos no fluorescentes (N- y C-terminal) se fusionan a proteínas de interés, de forma que si las dos proteínas interactúan, los fragmentos no fluorescentes se encuentran próximos en el espacio y reconstituyen la proteína fluorescente intacta, lo cual se puede visualizar utilizando microscopía de fluorescencia (**Figura 2**) (Kodama y Hu, 2012).

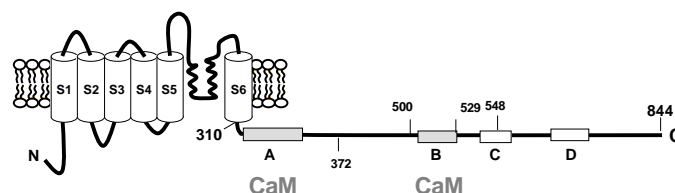


**Figura 2: Principio de la técnica BiFC.** En este ejemplo la estructura de la izquierda representa el fragmento N-terminal no fluorescente unido a la proteína X (hélice  $\alpha$  del dominio bZIP de la proteína Jun, conocido como bJun), donde el fluoróforo aparece marcado en amarillo. La estructura central representa el fragmento C-terminal no fluorescente unido a la proteína Y (hélice  $\alpha$  del dominio bZIP de la proteína Fos, conocido como bFos). La estructura de la derecha representa la proteína fluorescente reconstituida y el complejo proteico X/Y (dímero bJun/bFos)

(Kodama y Hu, 2012).

El ensayo BiFC es muy versátil dado que permite estudiar modificaciones post-transcripcionales, plegamiento, agregación, cambios conformacionales y topología proteica. No obstante, una de las mayores limitaciones de la técnica consiste en el autoensamblaje de los fragmentos no fluorescentes de casi todas las proteínas fluorescentes cuando se co-expresan en el mismo compartimento subcelular. Este autoensamblaje contribuye a aumentar el número de falsos positivos y a disminuir el ratio señal/ruido (S/N), dificultando la interpretación de los resultados (Kodama y Hu, 2010). Por ello, para poder revelar interacciones específicas se recomienda el uso de controles negativos, introduciendo mutaciones o deleciones en la superficie de interacción de una de las dos proteínas (Shyu *et al.*, 2008). Por otro lado, cabe destacar que la mayoría de los sistemas BiFC son irreversibles. Aunque esta irreversibilidad ofrece la posibilidad de analizar interacciones proteína-proteína transitorias y débiles, la realidad es que limita el uso de la técnica en interacciones dinámicas (Morell, 2007).

En este trabajo se ha estudiado la interacción de la calmodulina (CaM) con el canal Kv7.2. Para ello se han etiquetado estas proteínas con fragmentos no fluorescentes de la proteína Venus. Las proteínas Kv7.2 forman canales de potasio operados por voltaje que se encuentran en todo el sistema nervioso, donde cumplen funciones dominantes en el control de la excitabilidad y descargas neuronales (Haitin y Attali, 2008). Estos canales comparten una estructura común de 6 segmentos transmembrana (S1-S6) donde los dos últimos (S5 y S6) participan en la formación del poro y el filtro selectivo al potasio. Cuatro subunidades se ensamblan para formar tetrámeros funcionales. Los dominios N-terminal y C-terminal son intracelulares y este último presenta 4 regiones helicoidales (hélices A-B-C-D) cruciales para el ensamblaje, apertura y regulación del canal. Entre las proteínas implicadas en la regulación de estos canales, la calmodulina (CaM) juega un papel fundamental. La CaM es una proteína expresada en células eucariotas que une  $\text{Ca}^{2+}$  y está implicada en la regulación de una miríada de procesos celulares (Villarreal A. et al., 2014). Se ha descrito que la CaM actúa como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  modulando la apertura o el cierre de los canales Kv7 y regula el tráfico a la membrana plasmática (Haitin y Attali, 2008), (Alaimo, 2009). Hasta la fecha se ha demostrado que únicamente el dominio formado por las hélices A y B es capaz de interactuar con la CaM (Haitin y Attali, 2008), como se muestra en la **Figura 3**. En cambio no hay evidencias de que las hélices C y D puedan interactuar con la CaM, así que se utilizan como control negativo para el estudio de la interacción entre la CaM y el canal Kv7.2 en células vivas.



**Figura 3: Representación topológica 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.

## 1.1 OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo consiste en emplear la técnica BiFC para estudiar la

interacción entre los canales Kv7.2 y la CaM. Para ello se va a proceder a:

- Producir distintas construcciones del extremo N-terminal (silvestre o mutantes puntuales) de la proteína Venus fusionada a la CaM y del extremo C-terminal de la Venus unida al canal Kv7.2 (tanto a las hélices ABCD como a las hélices CD).
- Co-transfectar las distintas combinaciones de estas construcciones en células de mamífero (HEK293T).
- Analizar y cuantificar la intensidad de fluorescencia obtenida mediante microscopía confocal.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

#### 2.1.1 PCR Quick Change

Se diseñan oligonucleótidos para eliminar un sitio de corte HindIII al principio de la CaM y así poder reemplazar posteriormente la citrina que tiene unida por la región N-terminal (silvestre o mutantes puntuales) de la Venus. Estos oligonucleótidos se mandan a sintetizar por la compañía Integrated ADN Technologies (Idt). Para realizar la PCR se sigue el protocolo de la **Tabla 1**, que es similar a la metodología propuesta por la casa comercial (Agilent). Dicho protocolo se lleva a cabo por duplicado (con DMSO y sin DMSO). Posteriormente se añaden 0,5 µl del enzima DpnI a cada uno de los tubos y se deja incubando al menos una hora a 37°C. El siguiente paso consiste en realizar una electroforesis en gel de agarosa para determinar si hay producto amplificado. Más tarde, se realiza una transformación química, se eligen colonias, se realizan las minipreps de ADN y se lleva a cabo un chequeo para determinar que el ADN obtenido es el adecuado. Los pasos se explicarán detalladamente más adelante.

**Tabla 1: Protocolo PCR Quick Change.**

ADN (1:10)	Primers	DMSO	dNTPs	Buffer Pfu	Pfu	H <sub>2</sub> O
1 µl	[100 µM] 0,2 µl x 2	-	2 µl	2 µl	1 µl	13,6 µl
1 µl	[100 µM] 0,2 µl x 2	2 µl	2 µl	2 µl	1 µl	11,6 µl

Cada PCR consiste en 19 ciclos de amplificación divididos en las siguientes etapas: Temperatura de inicio (98°C, 1 min), separación de las hebras de ADN (95°C, 50 s), hibridación de los oligonucleótidos (55°C, 50 s), amplificación por la polimerasa (68°C, 10 min).

#### 2.1.2 Fusión de la región N-terminal de la Venus a la CaM y de la región C-terminal de la Venus al canal Kv7.2

##### 2.1.2.1 Fragmentos y vectores de expresión

Para realizar los experimentos de BiFC se utiliza por un lado la región N-terminal de la proteína fluorescente Venus en la forma silvestre, con la mutación V150A, con la mutación I152L y con

la doble mutación V150A/I152L. El objetivo de utilizar estas mutaciones consiste en reducir el autoensamblaje espontáneo de los fragmentos no fluorescentes, disminuyendo así el número de falsos positivos y aumentando el ratio señal/ruido (S/N). Por otro lado, se utiliza la región C-terminal de la proteína fluorescente Venus con la mutación A206K (evita la dimerización de las proteínas fluorescentes). Las construcciones N-terminal-Venus-CaM (silvestre o mutantes puntuales) se expresan en el vector pcDNA3 mientras que las construcciones C-terminal-Venus-Kv7.2 (hélices ABCD o CD) se expresan en el vector pcDNA3.1 His/Myc.

#### 2.1.2.2 Digestión de fragmentos y vectores, purificación y ligación

Se realiza la digestión de los ADN de los fragmentos y de los vectores durante 4 h a 37°C, siguiendo el protocolo de las **Tablas 2 y 3**. Posteriormente, se neutralizan las reacciones con 2 µl del tampón de carga 10X (50% glicerol, 0,2 M EDTA pH 8, 0,05% w/v azul de bromofenol) y mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón de electroforesis TBE 1X (para 1 L de TBE 5X: 54 g Tris, 57,5 ml ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,15 M pH 8) se separan los vectores y los fragmentos. Al gel de agarosa se le añade el agente intercalante bromuro de etidio y se utiliza el ADN fago lambda digerido con BstEII (Fermentas) como marcador de peso molecular. Las bandas correspondientes a los vectores y a los fragmentos se extraen del gel y se purifican utilizando el kit de purificación comercial GeneJet Gel Extraction (K0692, Fermentas). A continuación, se ponen a ligar los fragmentos y los vectores con T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente durante toda la noche, siguiendo el protocolo de la **Tabla 4**.

**Tabla 2: Protocolo de digestión para las construcciones N-terminal-Venus-CaM (silvestre y mutantes).**

ADN	Buffer Y+ [10X]	Enzimas de restricción	H <sub>2</sub> O
Fragmento 2 µl	2 µl	0,5 µl NheI 1 µl HindIII	14,5 µl
Vector 2 µl	2 µl	0,5 µl NheI 1 µl HindIII	14,5 µl

**Tabla 3: Protocolo de digestión para las construcciones C-terminal-Venus-Kv7.2 (hélices ABCD o CD).**

ADN	Buffer Y+ [10X]	Enzimas de restricción	H <sub>2</sub> O
Fragmento 2 µl	2 µl	0,5 µl NheI 0,5 µl BamHI	15 µl
Vector 2 µl	2 µl	0,5 µl NheI 0,5 µl BamHI	15 µl

**Tabla 4: Protocolo de ligación.**

Vector	Fragmento	Buffer de ligasa [10X]	T4 ligasa
1 µl	7,5 µl	1 µl	0,5 µl

#### 2.1.2.3 Transformación en bacterias *E.coli*

Las ligaciones se transforman en la cepa bacteriana *E. coli* BSJ (previamente preparadas para ser competentes) mediante un método basado en choques térmicos (transformación química). La

transformación se realiza añadiendo a 100  $\mu\text{l}$  de células competentes 5  $\mu\text{l}$  de plásmido obtenido de una ligación (o 5  $\mu\text{l}$  diluido más o menos a 0,001  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en tampón TE, en el caso de un plásmido procedente de una miniprep) más 45  $\mu\text{l}$  de tampón de transformación (TB 2X:  $\text{MgCl}_2$  40 mM,  $\text{CaCl}_2$  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  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y los restantes 100  $\mu\text{l}$  se resuspenden y se siembran en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado (ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Se incuban las placas durante un mínimo de 8 h, en una estufa a 37°C, hasta aparición de las colonias.

#### 2.1.2.4 Extracción y cuantificación de ADN

Para la obtención de ADN en pequeñas cantidades (miniprep), se suelen picar unas 4-5 colonias de cada placa utilizando palillos estériles y trabajando a la llama de un mechero Bunsen. Dichos palillos se dejan en un tubo de ensayo estéril ventilado que contiene 3 ml de medio LB con ampicilina de forma que las colonias crezcan en agitación durante toda la noche a 37°C. Una vez que las bacterias han crecido se cogen 2 ml de cultivo, se pasan a un tubo eppendorf de 2 ml y se procede al siguiente protocolo: (1) centrifugar brevemente al máximo; (2) resuspender el precipitado bacteriano 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 ácido 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. Finalmente se realiza un chequeo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% o 2% en tampón de electroforesis TBE 1X, siguiendo el protocolo de las **Tablas 5 y 6**. Con este protocolo se suele obtener una concentración de ADN de, aproximadamente, 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

**Tabla 5: Protocolo de chequeo para las construcciones N-terminal-Venus-CaM (silvestre y mutantes).**

DNA	Buffer Y <sup>+</sup> [10X]	Enzimas de restricción	H <sub>2</sub> O
Minipreps 1 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{l}$ NheI 0,2 $\mu\text{l}$ BsrGI	16,6 $\mu\text{l}$

**Tabla 6: Protocolo de chequeo para las construcciones C-terminal-Venus-Kv7.2 (hélices ABCD o CD).**

DNA	Buffer Y <sup>+</sup> [10X]	Enzimas de restricción	H <sub>2</sub> O
Minipreps 1 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	0,2 $\mu\text{l}$ NheI 0,2 $\mu\text{l}$ BamHI	16,6 $\mu\text{l}$

Para asegurarnos de que las muestras obtenidas son las correctas es necesario enviarlas al servicio de secuenciación de ADN Secugen de Madrid.

#### 2.1.2.5 Obtención de un elevado número de copias de ADN plasmídico (midipreps)

Con el objetivo de poder realizar los experimentos con células de mamífero es necesario obtener cantidades de ADN más elevadas y más puras que las que se obtienen con una miniprep. Para ello se realizan midipreps cuyo protocolo empieza picando con un palillo estéril la reserva

almacenada (glicerolada) de la construcción de interés y se añade a 100 ml de medio de cultivo LB con ampicilina. A continuación, se dejan incubando con agitación durante toda la noche a 37°C. Más tarde se lleva a cabo el protocolo de obtención de las midipreps utilizando el kit comercial Genopure Plasmid Midi Kit (3143414, Roche) y se realiza un chequeo mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% o 2% en tampón de electroforesis TBE 1X, siguiendo el mismo protocolo de las **Tablas 5 y 6**. Finalmente, el ADN se cuantifica por espectrofotometría (NanoDrop 2000) y se realizan los cálculos y las diluciones necesarias para obtener una concentración final de ADN de aproximadamente 1 µg/µl.

## **2.2 TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN CON CÉLULAS DE MAMÍFERO**

### **2.2.1 Mantenimiento de la línea celular HEK293T, levantamiento y siembra de células**

La línea celular HEK293T, que proviene de células embrionarias de riñón humano, crece en monocapa y es adherente. Su tiempo generacional es de 20-24 h y posee el origen de replicación del SV40 (pcDNA3.1). Una vez transfectadas se generan nuevas copias del plásmido y 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% CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> atmosférico y humedad relativa del 95%.

El primer paso consiste en levantar las células cuando éstas alcanzan el 70-80% de confluencia, lo cual se observa mirando al microscopio. Para ello se elimina el medio en el que se encuentran las células y se realiza un lavado con 1 ml de tampón de disociación (13151, Gibco Invitrogen). A continuación, se vuelve a aspirar el medio y se levantan las células con 1,5 ml de una mezcla de tampón de disociación y Tripsina-EDTA (25300, Gibco Invitrogen) (razón 1:1,5). Posteriormente se añaden 9 ml de medio DMEM sin antibiótico y se incuba durante 5 min a 37°C para que las células terminen de levantarse. Por último se prepara una mezcla de 9 ml de medio DMEM con antibiótico gentamicina (1:1000) y 4 ml de células levantadas y se añaden 2 ml de dicha mezcla a cada pocillo de la placa M6.

### **2.2.2 Método de transfección**

La polietilenimina (PEI, PolyScience ref: 23966-2 2gr) es un polímero con carga positiva que forma vesículas que atrapan el ADN y, cuando se fusionan a la membrana de las células, liberan el ADN. En un tubo se prepara una mezcla con 4,8 µl de PEI por µg de ADN a transfectar y se lleva hasta 50 µl con NaCl 150 mM y se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. Durante ese tiempo se preparan nuevos tubos de 50 µl con la mezcla de NaCl 150 mM y el ADN a transfectar (se utilizan los ADNs de las midipreps). A continuación, se añade el contenido de la mezcla de PEI y NaCl a cada tubo de ADN, se mezcla suavemente y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Después se aspira el medio y se pone 1 ml de medio fresco con gentamicina. Finalmente se añade la mezcla de PEI y ADN. Al cabo de 3-5 h de incubación se cambia el medio de las células, añadiendo 2 ml de medio nuevo con gentamicina.



### 2.2.3 Re-siembra de células

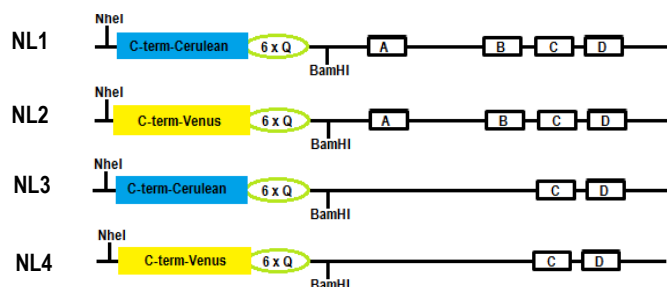
A los dos días tras la siembra, se debe realizar una re-siembra de las células que se observarán al microscopio. Para ello, previamente se deben tratar y esterilizar las placas Petri de 35 mm que se van a utilizar. En primer lugar se debe colocar un cubre de 25 mm sobre cada una de las placas. Posteriormente se tratan dichas placas con 1 ml de poli-L-lisina (P1524-100, Sigma-Aldrich) y se incuban durante 15 min bajo iluminación UV. A continuación, se recicla la poli-L-lisina y se hacen 3 lavados de cada placa con 1 ml de PBS, guardándolas en el incubador a 37°C hasta su utilización. El siguiente paso consiste en aspirar el medio de las células que han sido transfectadas y que se encuentran en la placa M6 para poder añadir 500 µl de tampón de disociación. Se vuelve a aspirar el medio y se añaden 500 µl de una mezcla de 1,5 ml de tampón de disociación y 0,5 ml de Tripsina-EDTA. Se añaden 2 ml de medio nuevo con gentamicina a cada uno de los pocillos y finalmente se re-siembran 80 µl de cada uno de los pocillos en las distintas placas Petri de 35 mm que han sido previamente tratadas. Cabe destacar que se re-siembran dos placas por pocillo y que se incuban a 37°C hasta su visualización en el microscopio.

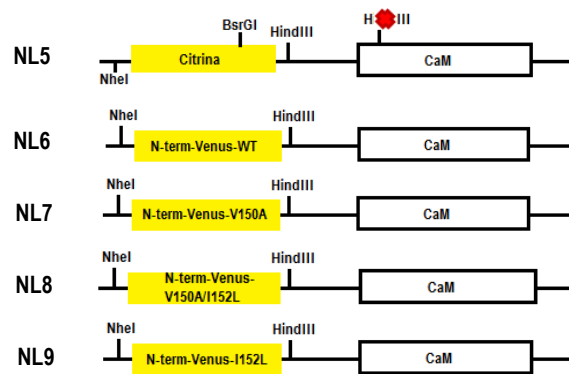
### 2.3 ESTUDIOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Las células se transfectan con las distintas construcciones 48 h antes del experimento. La adquisición de imágenes se realiza con el equipo Nikon TE2000-U (Nikon, Melville, NY, USA) 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 y el objetivo x10 con una apertura numérica de 0,25. Las imágenes se capturan con el microorificio (pinhole) abierto, lo que se corresponde con un diámetro de 150 µm. En este equipo se toman varias imágenes excitando los fluoróforos expresados en las células a una longitud de onda de 488 nm y detectando la fluorescencia a una longitud de onda de entre 515 nm y 530 nm. Las imágenes se analizan mediante el programa ImageJ (Versión WCIF, National Institutes of Health, USA), en el que se escoge un área de cada célula que presente una distribución homogénea de la fluorescencia (ROI, región de interés) y se mide la intensidad de cada construcción, y mediante el programa EZ C1 3.90 (Nikon). Se deduce que cuanto menor sea la intensidad de fluorescencia obtenida, menor será el autoensamblaje de los fragmentos no fluorescentes y menor número de falsos positivos habrá.

## 3. RESULTADOS

Primero se construyeron los diferentes clonajes que luego serían utilizados para los experimentos de BiFC:

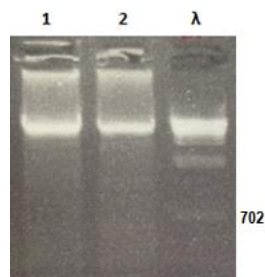




**Figura 4: Clonajes.** NL1: C-term-Cerulean-Kv7.2 ABCD; NL2: C-term-Venus-Kv7.2 ABCD; NL3: C-term-Cerulean-Kv7.2 CD; NL4: C-term-Venus-Kv7.2 CD; NL5: Citrina-CaM sin sitio de corte HindIII; NL6: N-term-Venus WT-CaM; NL7: N-term-Venus-V150A-CaM; NL8: N-term-Venus-I152L-CaM; NL9: N-term-Venus-V150A/I152L-CaM.

### 3.1 PCR QUICK CHANGE

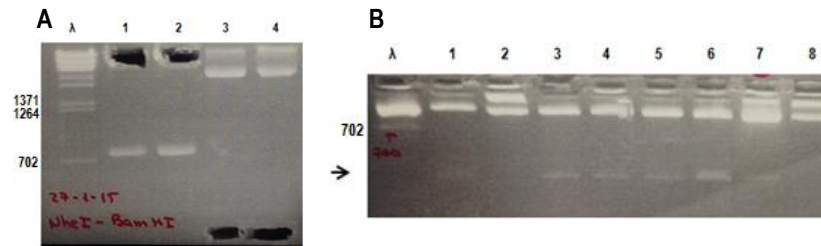
Con el fin de poder realizar los clonajes, primero se llevó a cabo una PCR Quick Change para eliminar un sitio de corte HindIII al principio de la CaM y así poder reemplazar posteriormente la citrina que tiene unida por la región N-terminal (silvestre o mutantes puntuales) de la Venus. El fragmento obtenido es de 6600 pb y en el gel (**Figura 5**) se observa que se ha obtenido producto amplificado con el tamaño adecuado. Gracias a esta PCR se pudieron realizar las construcciones NL6, NL7, NL8 y NL9 (ver **Figura 4**).



**Figura 5: Gel de agarosa al 1% con los productos de la PCR.** Calle 1: amplificado del vector empleando DMSO; calle 2: amplificado del vector sin emplear DMSO; calle λ: marcador de peso molecular.

### 3.2 DIGESTIONES Y CHEQUEOS

Una vez realizada la PCR, se llevaron a cabo las digestiones de los distintos fragmentos y sus respectivos vectores. En las construcciones NL6, NL7, NL8 y NL9 (ver **Figura 4**) se utilizaron las enzimas de restricción NheI y HindIII, mientras que en las construcciones NL1, NL2, NL3 y NL4 (ver **Figura 4**) se utilizaron las enzimas de restricción NheI y BamHI. Una vez realizada la digestión, se purificaron las bandas de los distintos fragmentos y vectores (**Figura 6 A**). Finalmente, se pusieron a ligar los fragmentos con sus respectivos vectores durante toda la noche. Posteriormente se chequearon las ligaciones con las enzimas de restricción NheI y BsrGI para las construcciones NL6, NL7, NL8 y NL9 (ver **Figura 4**) y con las enzimas de restricción NheI y BamHI para las construcciones NL1, NL2, NL3 y NL4 (ver **Figura 4**). Los fragmentos obtenidos fueron de 950 y 250 pb respectivamente (**Figura 6 B**).

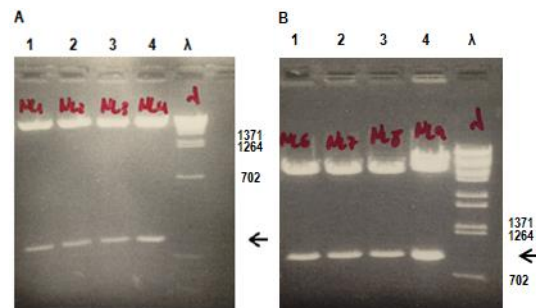


**Figura 6: Geles de agarosa al 1% y 2% con las digestiones y los chequeos.** (A) Digestiones. Calle  $\lambda$ : marcador de peso molecular; calles 1 y 2: digestión y purificación del vector que contiene Kv7.2-ABCD con NheI y BamHI; calles 3 y 4: digestión y purificación de los fragmentos C-terminal-Cerulean y C-terminal-Venus con NheI y BamHI. El resto de vectores y fragmentos se han obtenido de forma análoga. (B) Chequeos. Calle  $\lambda$ : marcador de peso molecular; calles 1-8: digestión de las minipreps de la construcción NL1 con NheI y BamHI. El resto de construcciones se han obtenido de forma análoga.

Los resultados muestran una correcta construcción de los clonajes debido a que las bandas obtenidas son las esperadas. Para asegurarnos de que las muestras obtenidas son las correctas es recomendable, en algunas ocasiones, enviarlas al servicio de secuenciación de ADN Secugen de Madrid.

### 3.3 CHEQUEOS MIDIPREPS

Una vez realizadas las midipreps, se chequearon con las enzimas de restricción NheI y BsrGI para las construcciones NL6, NL7, NL8, NL9 (ver **Figura 4**) y con las enzimas de restricción NheI y BamHI para las construcciones NL1, NL2, NL3 y NL4 (ver **Figura 4**). Los fragmentos obtenidos fueron de 950 y 250 pb respectivamente (**Figura 7, A y B**).



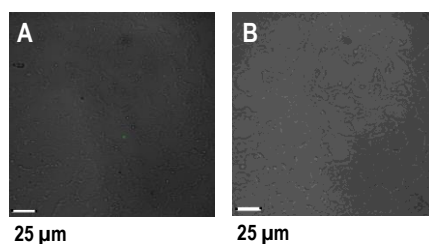
**Figura 7: Geles de agarosa al 2% y 1% con los chequeos de las midipreps.** (A) Calles 1-4: digestión de las midipreps de las construcciones NL1, NL2, NL3 y NL4 con NheI y BamHI; calle  $\lambda$ : marcador de peso molecular. (B) Calles 1-4: digestión de las midipreps de las construcciones NL6, NL7, NL8 y NL9 con NheI y BsrGI; calle  $\lambda$ : marcador de peso molecular.

Los resultados muestran una correcta realización de las midipreps debido a que las bandas obtenidas son las esperadas.

### 3.4 ESTUDIOS BiFC

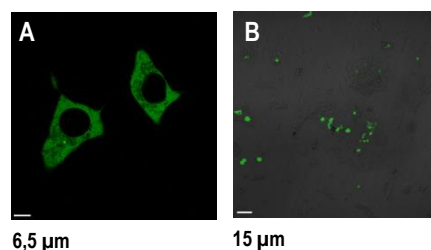
Una vez obtenidos los distintos clonajes, se co-transfectaron las células con distintas combinaciones de éstos para finalmente realizar estudios de BiFC utilizando el microscopio confocal. No todos los clonajes construidos se pudieron transfectar en células por falta de tiempo, como fue el caso de NL1 y NL3. Los grupos que se realizaron fueron los siguientes: NL2, NL6, NL6+NL2, NL7+NL2, NL8+NL2, NL9+NL2, NL6+NL4, NL7+NL4, NL8+NL4,

NL9+NL4 (ver **Figura 4**). Las imágenes obtenidas utilizando el microscopio confocal se muestran en las **Figuras 8, 9, 10 y 11**:



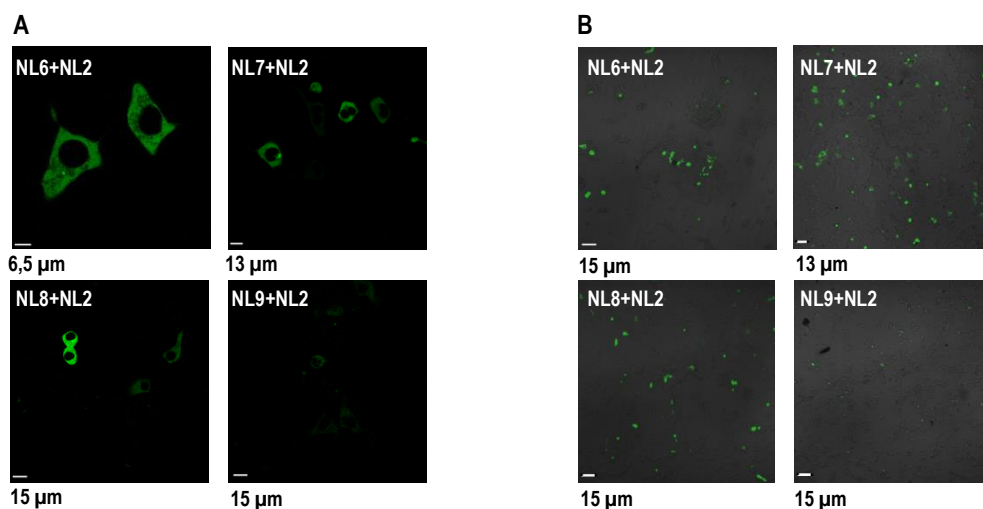
**Figura 8: Imágenes de microscopía confocal de los controles (objetivo x10).** (A) Grupo NL6 (N-VenusWT-CaM). (B) Grupo NL2 (C-Venus-ABCD).

En primer lugar se analizaron las proteínas NL6 (N-VenusWT-CaM) y NL2 (C-Venus-ABCD). Al tratarse de fragmentos no fluorescentes que se transfectaron solos, no tienen la posibilidad de reconstituir la proteína fluorescente intacta, por lo que no se debería observar fluorescencia (**Figura 8**). En el caso del grupo NL2 se cumple, sin embargo, en el caso del grupo NL6 se observa una leve fluorescencia intrínseca en algunas células que puede deberse al fluoróforo que se encuentra en la región N-terminal de la Venus.



**Figura 9: Imágenes de microscopía confocal del grupo NL6+NL2 (N-VenusWT-CaM + C-Venus-ABCD).** (A) Objeto x60. (B) Objeto x10.

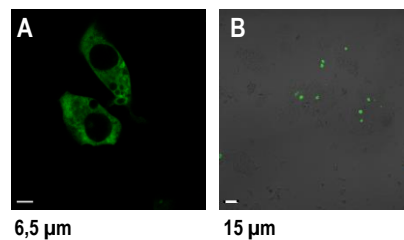
Las imágenes obtenidas con el grupo NL6+NL2 (N-VenusWT-CaM + C-Venus-ABCD) muestran unas células fluorescentes como era de esperar. Este experimento sugiere que la CaM y las hélices A y B del canal Kv7.2 están interaccionando y, de esta forma, aproximan los dos fragmentos de la Venus que, finalmente, puede reconstituirse (**Figura 9**).



**Figura 10: Imágenes de microscopía confocal de los grupos NL6+NL2 (N-VenusWT-CaM + C-Venus-ABCD), NL7+NL2 (N-VenusV150A-CaM + C-Venus-ABCD), NL8+NL2 (N-VenusI152L-CaM + C-Venus-ABCD) y**

NL9+NL2 (N-VenusV150A/I152L-CaM + C-Venus-ABCD). (A) Objetivo x60. (B) Objetivo x10.

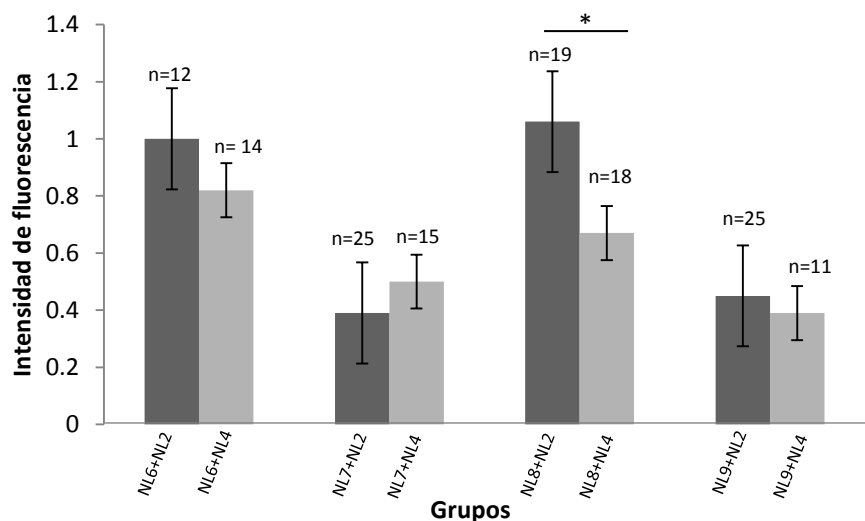
Como ya se ha comentado, se utilizaron los distintos mutantes (**Figura 10**) porque se ha descrito que reducen el autoensamblaje espontáneo de los fragmentos no fluorescentes (Kodama y Hu, 2010), disminuyendo el número de falsos positivos y aumentando el ratio señal/ruido (S/N). Los grupos NL7+NL2 (N-VenusV150A-CaM + C-Venus-ABCD) y NL9+NL2 (N-VenusV150A/I152L-CaM + C-Venus-ABCD) cumplen con esta previsión porque se observa una reducción de la fluorescencia. Sorprendentemente, en el caso del grupo NL8+NL2 (N-VenusI152L-CaM + C-Venus-ABCD) la intensidad de fluorescencia obtenida es prácticamente la misma o incluso algo mayor que el grupo NL6+NL2 (N-VenusWT-CaM + C-Venus-ABCD).



**Figura 11:** Imágenes de microscopía confocal del grupo NL6+NL4 (N-VenusWT-CaM + C-Venus-CD). (A) Objetivo x60. (B) Objetivo x10.

El grupo NL6+NL4 (N-VenusWT-CaM + C-Venus-CD) no debería presentar fluorescencia, ya que no se ha demostrado que la CaM interacte con las hélices C y D del canal Kv7.2 (**Figura 11**). No obstante, se observa que sí hay fluorescencia, por lo que se deduce que podría haber ocurrido el autoensamblaje de los fragmentos no fluorescentes o la interacción de la CaM con dichas hélices.

Para poder analizar los resultados obtenidos se empleó el programa ImageJ y se cuantificó el nivel de fluorescencia de las células, seleccionando las áreas donde la proteína se encontraba repartida más homogéneamente (ROI, región de interés) (**Figura 12**). Las imágenes y la cuantificación de los grupos NL7+NL4 (N-VenusV150A-CaM + C-Venus-CD), NL8+NL4 (N-VenusI152L-CaM + C-Venus-CD) y NL9+NL4 (N-VenusV150A/I152L-CaM + C-Venus-CD) se realizó del mismo modo que en el resto de grupos.



**Figura 12:** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. n = número de células analizadas. \*  $P \leq 0.05$ ,

prueba t de Student desapareada.

Una vez cuantificada la fluorescencia lo que se observa es que claramente las mutaciones reducen el autoensamblaje de los fragmentos no fluorescentes, pero en el caso del grupo NL8+NL2 el resultado obtenido no es el esperado según lo descrito en la literatura (Kodama y Hu, 2010). En el caso de los grupos NL6+NL4, NL7+NL4, NL8+NL4 y NL9+NL4 también se observa un discreto nivel de fluorescencia, lo cual nos hace pensar que la CaM podría estar interaccionando con las hélices C y D del canal Kv7.2 o que ha habido autoensamblaje de los fragmentos no fluorescentes.

#### 4. DISCUSIÓN

Mediante los experimentos realizados y gracias a la cuantificación de la intensidad de fluorescencia obtenida 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, se ha visto que la CaM es capaz de unirse al dominio formado por las hélices A y B de los canales Kv7.2, como se evidencia observando una mayor fluorescencia en los grupos NL6+NL2, NL7+NL2, NL8+NL2 y NL9+NL2 (**Figuras 9 y 10**), en comparación con los grupos en los que solo están presentes las hélices C y D del canal Kv7.2. Se asume que el nivel de expresión de las proteínas ha sido el mismo en todas las células (lo ideal hubiese sido realizar un Western Blot para determinar el nivel de expresión de las proteínas, pero por falta de tiempo no se pudo llevar a cabo). Por otro lado, también se ha observado fluorescencia en los grupos NL6+NL4, NL7+NL4, NL8+NL4 y NL9+NL4 de manera que no se puede excluir la posibilidad de que el dominio formado por las hélices C y D del canal Kv7.2 interaccione con la CaM. Otra posible explicación a la aparición de fluorescencia en estos grupos puede ser que se haya dado un autoensamblaje de los fragmentos no fluorescentes de la Venus, y para ello es necesario seguir investigando en esta dirección y optimizar las condiciones experimentales, explorando condiciones para reducir los niveles de expresión, eligiendo controles negativos correctos y reduciendo la población celular analizada.

En cuanto a las mutaciones se puede afirmar que reducen la intensidad de fluorescencia obtenida, de modo que se asume que disminuyen el autoensamblaje de los fragmentos no fluorescentes y, por tanto, el número de falsos positivos. No obstante, hay que tener en cuenta las condiciones experimentales empleadas. Además, la mutación I152L aumenta la intensidad de la fluorescencia obtenida de forma análoga a la proteína silvestre cuando se transfecta con la construcción NL2 (C-Venus-ABCD), por lo que en futuros experimentos habría que seguir investigando el efecto anómalo de este mutante que no se corresponde con lo descrito en la literatura. Una posible explicación es que en nuestras condiciones la densidad de donante y aceptor era tan elevada que daba lugar a interacciones no fisiológicas, resultando en autoensamblaje y fluorescencia.

#### 5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que las condiciones experimentales no han sido las óptimas y que ha faltado tiempo para completar los experimentos se puede concluir:

- Los ensayos de BiFC confirman que la CaM, principal sensor de calcio, interacciona con el dominio formado por las hélices A y B de los canales Kv7.2. Los resultados obtenidos sugieren que no podemos descartar que también el dominio formado por las hélices C y D pueda interactuar con la CaM, de modo que habría que seguir investigando.

- La introducción de las mutaciones en la región N-terminal de la CaM reduce la intensidad de la fluorescencia obtenida, lo cual se traduce en una disminución del autoensamblaje de los fragmentos no fluorescentes y del número de falsos positivos. La transfección de la mutación I152L con la construcción NL2 (C-Venus-ABCD) es una excepción que no se corresponde con lo descrito en la literatura, ya que aumenta la intensidad de la fluorescencia obtenida. Por ello, se podría seguir investigando en esta línea.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Alaimo, A., Gómez-Posada, J.C., Aivar, P., Etxeberría, A., Rodríguez-Alfaro, J.A., Areso, P. y Villarroel, A. (2009). Calmodulin Activation Limits the Rate of KCNQ2 K<sup>+</sup> Channel Exit from the Endoplasmic Reticulum. *The Journal Of Biological Chemistry*. 284(31), 20668-20675.

Haitin, Y. y Attali, B. (2008). The C-terminus of Kv7 channels: a multifunctional module. *J. Physiol*. 586, 1803-1810.

Kerppola, T.K. (2006). Design and Implementation of Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Assays for the Visualization of Protein Interactions in Living Cells. *Nat Protoc*. 1(3), 1278-1286.

Kerppola, T.K. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys*. 37, 465-487.

Kodama, Y. y Hu, C.D. (2010). An improved bimolecular fluorescence complementation assay with a high signal-to-noise ratio. *BioTechniques*. 49, 793-805.

Kodama, Y. y Hu, C.D. (2012). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives. *BioTechniques*. 53, 285-298.

Morell, M., Espargaró, A., Avilés, F.X. y Ventura, S. (2007). Detection of transient protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation: the Abl-SH3 case. *Proteomics*. 7, 1023-1036.

Shyu, Y.J., Fox, S.M., Duren, H.M., Ellis, R.E., Kerppola, T.K. y Hu, C.D. (2008). Visualization of protein interaction in living *Caenorhabditis elegans* using bimolecular fluorescence complementation analysis. *Nat. Protoc*. 4, 588-596.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem*. 67, 509-544.

Villarroel A., Tagliatalata M., Bernardo-Seisdedos G., Alaimo A., Agirre J., Alberdi A., Gomis-Perez C., Soldovieri M.V., Ambrosino P., Malo C. y Pilar Areso. (2014). The Ever Changing Moods of Calmodulin: How Structural Plasticity Entails Transductional Adaptability. *J. Mol. Biol*. 426, 2717-2735.

Yang, F., Moss, L.G. y Phillips, G.N. Jr. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol*. 14, 1246-1251.