



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Desarrollo de un ensayo de unión tipo
FRET entre un dominio de unión a
nucleótidos cíclicos y AMPc**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A

MARÍA DEL CARMEN SANTANA CALVO

DIRECTOR DE TESIS
DR. TAKUYA NISHIGAKI SHIMIZU



MEXICO, D. F.

2015

1. Datos del alumno

María del Carmen
Santana
Calvo
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304816576

2. Datos del tutor

Dr.
Takuya
Nishigaki
Shimizu

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Tatiana
Fiordelisis
Coll

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Carmen Nina
Pastor
Colón

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Claudia
Segal
Kischinevzky

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Roberto Carlos
Muñoz
Garay

7. Datos del trabajo escrito

Desarrollo de un ensayo de unión tipo FRET entre un dominio de unión a nucleótidos cíclicos y AMPc
80 p.
2015

A mis papás.

A mi amiga Priscila Lorea.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi papá, mi mamá y mi hermano por todo el amor, paciencia, educación, comida y consejos que me han dado. Es imposible explicar lo que significan para mí y a pesar de que ya no vivamos todos juntos siempre están en primer plano.

Así mismo, agradezco a toda mi familia. En especial a mis abuelitos, por ser el motor que mueve a la familia. A mi tía Susy y mi tío Roberto, por todo el cariño que me han dado. A mi tía Jenny y mi tío Toño, por enseñarme a luchar por lo que quiero.

Agradezco afectuosamente a mi tutor, el Dr. Takuya Nishigaki, por todo el tiempo que dedicó al proyecto. Por ser un maestro y guía tanto en lo académico como en lo humano.

De igual manera, quiero agradecer a la M. en C. Yoloxóchitl Sánchez Guevara por ser compañera, amiga, maestra y cómplice en el laboratorio. Sin tu apoyo y consejos esta tesis nunca se habría completado.

A todos los integrantes del laboratorio del consorcio de fisiología del espermatozoide, mi estancia en el laboratorio no hubiera sido la misma sin ustedes.

A los fundadores del Instituto Down y demás amigos del IBt. Marel, Cris, Oriana, Vilma, Viridiana, Adriana, Sandra, Gigi (mongui-brother), Francisco, Checho, y Fabio. Sin ustedes Cuernavaca hubiera sido peor que todos los círculos del infierno juntos.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias, Claudia Itzel (Bacteria), Erandi, Ricardo, Ana Mercedes, Olga, Ulises, Daniela y Rodrigo. Por estar ahí cuando más lo necesitaba.

A mis amigas de toda la vida Anahí, Lili y Martha. Sé que la distancia y el tiempo nunca nos separarán.

A mis sinodales, la Dra. Tatiana Fiordelisio, la Dra. Nina Pastor, la Dra. Claudia Segal y el Dr. Carlos Garay por sus comentarios críticos y excelentes sugerencias a este trabajo.

De manera muy especial, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a todas las personas que conocí en la Facultad de Ciencias y en el Instituto de Biotecnología durante este largo trayecto.

Por último, a Ana Laura. No hay palabras suficientes para plasmar aquí todo lo que quisiera decirte. Gracias por la compañía, las risas y las películas.

Este trabajo se realizó en el laboratorio número 16 del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, México), bajo la asesoría del Dr. Takuya Nishigaki Shimizu.

Para la realización de esta tesis de licenciatura se recibió apoyo de los siguientes donativos:

CONACYT Ciencia Básica (56660 y 177138) y DGAPA-PAPIIT (IN221110 y IN203513).

Durante la fase experimental de este trabajo se contó con el apoyo técnico de:

El M. en C. Jorge Arturo Yáñez, el M. en C. Eugenio López Bustos y el Dr. Paul Gaytán, de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas del Instituto de Biotecnología, UNAM Campus Morelos.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIACIONES	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Transducción de señales y la señalización intracelular	6
1.1.1 Importancia del AMPc en la señalización intracelular	8
1.2. Dominios conservados que coordinan NMPc.	9
1.2.1. GAF	10
1.2.2. CNBD	11
1.2.2.1. CAP	12
1.2.2.2. PKA	13
1.2.2.3. Canales iónicos CNG y HCN	13
1.2.2.4. EPAC	14
1.2.2.5. CRIS	15
1.3. Posibles dominios CNBDs encontrados por análisis bioinformático.....	15
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Métodos para estudiar la interacción molecular entre los CNBD y el AMPc	17
2.1.1. Utilizando AMPc marcado	17
2.1.1.1. Separación mecánica	17
2.1.1.2. Anisotropía	17
2.1.1.3. Fluoróforos sensibles al ambiente	18
2.1.2. Utilizando AMPc inmovilizado	19
2.1.2.1. Resonancia plasmónica superficial (“Surface Plasmon Resonance”)	19
2.1.3. Utilizando AMPc no marcado	19
2.1.3.1. Calorimetría isotérmica de titulación	19
2.1.3.2. Espectrofotometría de dicroísmo circular	20
2.1.3.3. Espectrofluorometría del triptófano	20
2.1.3.4. FRET entre proteínas fluorescentes.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	26

5. OBJETIVO	26
5.1. Objetivo general	26
5.2. Objetivos particulares.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1. Materiales.....	27
6.2. Métodos	29
7. RESULTADOS.....	37
7.1. Diseño y clonación de la construcción de EPAC I-mECFP	37
7.2. Diseño y clonación de EPAC-tdTomate	39
7.3. Expresión, purificación y cuantificación de las quimeras	41
7.4. Espectros de fluorescencia de los fluoróforos	42
7.5. Ensayo de unión.....	43
8. DISCUSIÓN.....	50
9. CONCLUSIONES.....	58
10. PERSPECTIVAS	59
11. REFERENCIAS	60
12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	70

ABREVIACIONES

145cp Venus	Permutación circular de la proteína fluorescente Venus, el nuevo extremo amino empieza en el aminoácido 145 de la proteína Venus silvestre
8-fluo-AMPC	8- (2- [Fluoresceinil]-aminoetil) adenosina- 3', 5'- monofosfato cíclico
AC	Adenilato ciclasa
AKAP	Proteínas de anclaje para cinasas-A
AMPC	3', 5' Adenosín monofosfato cíclico
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosín trifosfato
C-terminal	Carboxilo terminal
Ca ²⁺	Ion calcio
CAP	Proteína activadora por catabolitos
CFP	Proteína cian fluorescente
CNBD	Dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CNBDH	Dominio homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos
CNG	Canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos
CO	Monóxido de carbono
CooA	Activador transcripcional dependiente de monóxido de carbono
CprK	Regulador transcripcional de la deshalogenasa reductora de o-clorofenol
CRIS	Receptor de AMPC involucrado en el funcionamiento del espermatozoide
DAG	Diacil glicerol
DD	Dominio de dimerización y acoplamiento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPAC	Proteína dependiente de AMPC que intercambia nucleótidos de guanina en las proteínas G pequeñas
FhlA	Activador transcripcional de la formiato hidrógeno liasa
FRET	Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia de Förster
g	Fuerza G
GAF	Dominio nombrado por las fosfodiesterasas específicas para GMPc, adenilato ciclasa y la FhIA
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente
GMPc	3', 5' Guanosín monofosfato cíclico
HCN	Canales iónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos
hERG	Canal relacionado con los canales <i>ether-à-go-go</i> de humano

I. F. N	Intensidad de fluorescencia normalizada
IP ₃	Inositol 1,4,5- trifosfato
KCNH	Familia de canales de potasio dependientes de voltaje relacionados con hERG
K _d	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
LB	Caldo lisogénico
min	Minuto
mECFP	CFP monomérica mejorada (Enhanced monomeric CFP)
N-terminal	Amino terminal
Ni ²⁺	Ion níquel
NMPc	Nucleótido cíclico
NO	Óxido nítrico
PAS	Dominio de señalización Per-Arnt-Sim
pb	Pares de bases
PBC	Casete de unión a fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc
<i>r</i>	Valor de anisotropía
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SMBD	Dominio de unión a moléculas pequeñas
<i>sp.</i>	Especie
TAE	Tris-acetato-EDTA
T _m	Temperatura de fusión
U. A. F.	Unidades arbitrarias de fluorescencia
YFP	Proteína amarilla fluorescente
α	Alfa
β	Beta

RESUMEN

Los nucleótidos cíclicos (NMPc) son segundos mensajeros que se encargan de regular distintas funciones celulares mediante su unión específica a sus proteínas blanco. Dentro de los NMPc encontramos al 3', 5' adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual tiene un papel importante en la regulación del metabolismo, expresión génica, diferenciación celular, transporte de iones a través de membranas, regulación del pH citosólico y secreción, entre otros. Para que una misma molécula pueda regular tan distintos procesos se requiere de una fina regulación espacio-temporal de su concentración. Con este propósito, en la célula, se llegan a formar microdominios de AMPc, donde éste puede regular de manera específica a sus proteínas blanco.

Hasta ahora, las principales proteínas blanco reguladas por AMPc que se conocen son: las proteínas cinasas dependientes de AMPc (PKA), las proteínas dependientes de AMPc que intercambian nucleótidos de guanina en las proteínas G pequeñas (EPAC), los canales iónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos (HCN), los canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (CNG), la proteína activadora por catabolitos (CAP) y el receptor de AMPc involucrado en el funcionamiento del espermatozoide (CRIS). Todas estas proteínas tienen en común la presencia de una secuencia conservada llamada dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD, por sus siglas en inglés).

En el año 2007, por análisis bioinformático, se encontraron otras proteínas que poseen la secuencia que codifica para este dominio. Además, en la literatura, se pueden encontrar varios reportes de proteínas que poseen este dominio pero su actividad no está regulada por AMPc. Tal es el caso de los canales iónicos pertenecientes a la familia KCNH (canales de potasio dependientes de voltaje y relacionados con hERG) y los factores de transcripción CoxA (activador transcripcional dependiente de monóxido de carbono) y CprK (regulador transcripcional de la deshalogenasa reductora de o-clorofenol). A este grupo de dominios no funcionales se les decidió llamar dominio homólogo al dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBDH, por sus siglas en inglés).

Para entender el papel fisiológico de las proteínas que poseen dominios CNBD y su regulación, es importante corroborar la actividad de los dominios predichos mediante métodos bioquímicos. En este trabajo, desarrollamos un nuevo método para analizar la interacción entre

CNBDs y NMPc usando la técnica de transferencia de energía por resonancia de Förster entre diferentes moléculas (FRET intermolecular). Para ello, preparamos proteínas recombinantes con el CNBD de EPAC I fusionado a una proteína fluorescente (FP), la cual fungió como par FRET para un análogo fluorescente de AMPc llamado 8-fluo-AMPc.

Nuestro método obtuvo resultados positivos, ya que la construcción diseñada logró funcionar como un sensor molecular de interacción a AMPc *in vitro*. Además, la eficiencia y grado de sensibilidad a la especificidad de la interacción, se manifestó al usar la construcción quimérica teniéndola incluso sin purificar, lo que disminuye el tiempo de trabajo experimental sin mermar la precisión y validez del ensayo.

1. INTRODUCCIÓN

Todos los seres vivos están formados por células que poseen una membrana lipídica que se encarga de delimitar su periferia (Nelson & Cox, 2005). Esta definición espacial le permite a la célula constituirse como una unidad metabólica funcional que además tiene la capacidad de replicación.

Debido al constante bombardeo de información proveniente del ambiente, las células necesitan responder de forma orquestada para sobrevivir. Existen varios tipos de estímulos externos, como la luz, la temperatura, la gravedad, la presión, el pH, la composición iónica, compuestos moleculares, etcétera.

Los estímulos mediados por compuestos moleculares pueden dividirse, *grosso modo*, en sustancias químicas capaces de difundir libremente a través de la membrana celular (permeables) y moléculas que no pueden hacerlo (impermeables). Las primeras son por lo general moléculas pequeñas como el óxido nítrico y/o moléculas hidrofóbicas como las hormonas esteroideas. Su capacidad de permear la membrana celular les permite activar directamente a su proteína blanco en el interior de la célula.

En cambio, los compuestos impermeables están formados por moléculas de mayor tamaño y/o hidrofílicas por lo que transmiten su información mediante receptores que se encuentran en la membrana celular (Alberts *et al.*, 2008). Estos receptores, al recibir un estímulo lo transducen a una señal intracelular, activando una o varias vías de señalización (Hunter, 2000). Este proceso celular mediante el cual la célula responde a estímulos del ambiente con modificaciones químicas en su interior es un mecanismo de recepción y transformación de señales fisicoquímicas llamado transducción de señales.

Las señales intracelulares se encuentran mediadas por segundos mensajeros, que son moléculas que se encargan de propagar y amplificar la señal del exterior dentro de la célula. Estas moléculas, dependiendo de su composición, pueden difundir libremente en el citosol o quedarse embebidos en la membrana. Entre los más conocidos se encuentran el ion Ca^{2+} , monóxido de nitrógeno (NO), 1,2-diacilglicerol (DAG), inositol 1,4,5- trifosfato (IP_3), los fosfatidil inosoles (PIP_2 y PIP_3) y los nucleótidos cíclicos (NMPc) (Hunter, 2000).

1.1. Transducción de señales y la señalización intracelular

Como se mencionó anteriormente, la transducción de señales comienza cuando un estímulo externo activa a su receptor. En los organismos unicelulares la mayoría de los estímulos provenientes del medio externo corresponden a cambios en la concentración de moléculas que sirven como nutrientes, por ejemplo fosfatos, glucosa y aminoácidos (Cooper & Hausman, 2007). En algunos casos, esas moléculas son secretadas por otros organismos, por lo que existe una comunicación célula-célula. Este es el caso del “quorum sensing”, donde la expresión génica es regulada en respuesta a la densidad poblacional (Jayaraman & Wood, 2008). En el caso de los organismos pluricelulares, la comunicación entre células debe de estar finamente regulada para mantener al organismo completo (Karp, 2008). Generalmente, esta comunicación se da mediante moléculas que son secretadas al medio extracelular. Estas señales pueden viajar distancias cortas y estimular células cercanas (comunicación parácrina) e incluso a la misma célula (comunicación autócrina). También las señales pueden viajar a lo largo del individuo y comunicar el mensaje a células que se encuentran en otros órganos (comunicación endócrina).

La interacción entre la molécula señalizadora (ligando) y su receptor es muy específica y ocurre a concentraciones muy bajas de ligando ya que su constante de disociación (K_d) es del orden de nM (Alberts *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, los receptores se encuentran en la membrana plasmática y su región extracelular es la que se encarga de interactuar con el ligando. Cuando ocurre la unión, el receptor sufre un cambio conformacional que se propaga hasta su región intracelular. Este cambio conformacional transmite la señal activando una enzima cercana (ej. adenilato ciclasa), la cual produce un segundo mensajero (ej. AMPc). Dependiendo de la estructura química del segundo mensajero, este puede difundir hacia el citosol o permanecer en la bicapa lipídica (Lodish *et al.*, 2008).

Los segundos mensajeros modifican, mediante cambios conformacionales, la actividad de sus proteínas blanco. A su vez, éstas también generan cambios en la conformación de las proteínas que se encuentran río abajo en la vía modificando su actividad (figura 1). Cabe mencionar que la mayoría de las proteínas involucradas en las vías de señalización son modulares, es decir, están construidas por múltiples dominios, lo que les permite interactuar simultáneamente con diversas proteínas, regular su actividad mediante dominios regulatorios y tener actividad enzimática mediante dominios catalíticos (Karp, 2008).

La transmisión y amplificación de la señal casi siempre está mediada por la adición o remoción de grupos fosfato en las proteínas de la vía. Estas fosforilaciones y desfosforilaciones están mediadas por cinasas y fosfatasas, respectivamente. La mayoría de las cinasas fosforilan a sus proteínas blanco en residuos de serina y treonina, aunque también existe un grupo muy importante de cinasas que fosforilan residuos de tirosina. Muchos de los sustratos de las cinasas son otras enzimas (la mayoría son otras cinasas), no obstante la modificación de la actividad de canales iónicos y factores de transcripción por fosforilaciones es elemental para la homeostasis celular. Estas fosforilaciones pueden activar o inactivar enzimas, incrementar o reducir la interacción con otras proteínas, inducir el movimiento de la proteína a otro compartimento celular o servir como etiqueta para su degradación.

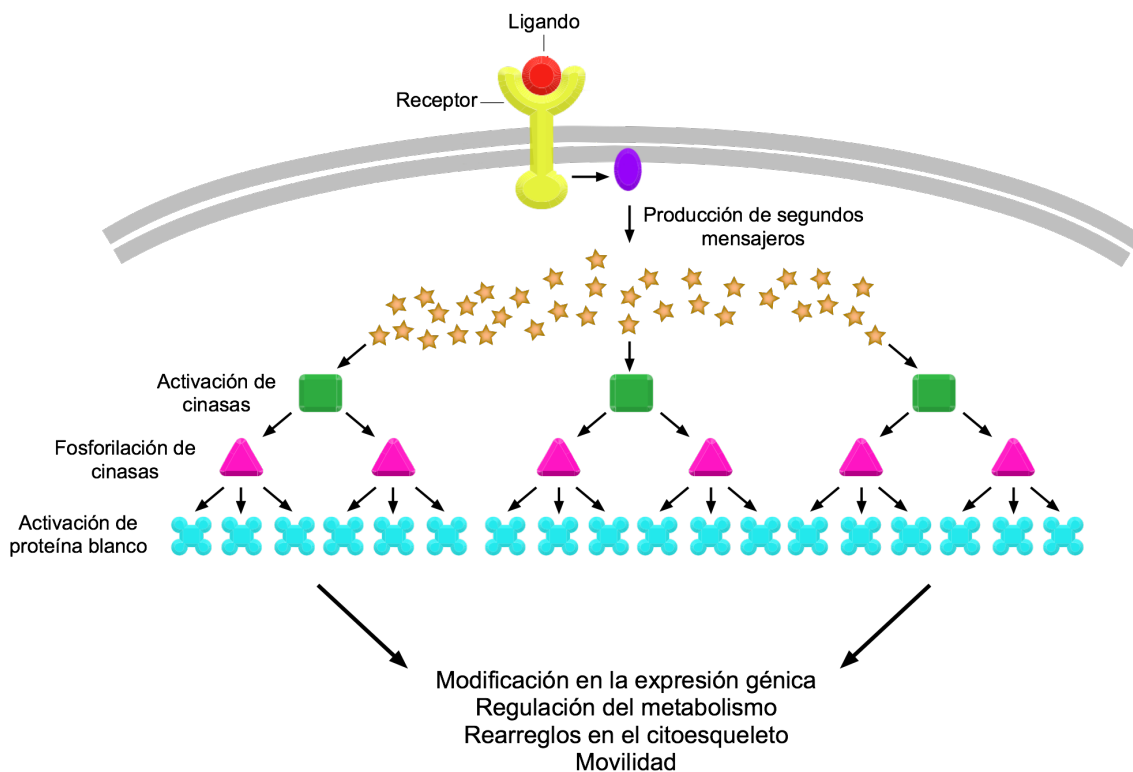


Figura 1. Ejemplo de vía de señalización intracelular simplificada. La vía comienza cuando la señal extracelular, en este caso un ligando externo (círculo rojo) se une a su receptor transmembranal (figura amarilla). Esta unión genera un cambio conformacional que propaga la señal activando una enzima cercana (óvalo morado), la cual comienza a producir segundos mensajeros (estrellas anaranjadas). Los segundos mensajeros activan a sus blancos modificando su actividad. En este ejemplo, los segundos mensajeros activan cinasas (rectángulos verdes), los cuales fosforilan otras cinasas río abajo en la vía (triángulos rosas). Estas cinasas activan a la proteína efectora (figura azul) quien se encarga de modificar funciones en la célula (Modificado de Alberts *et al.*, 2008).

Las señales transmitidas a lo largo de las vías de señalización intracelular alcanzan, al final, proteínas involucradas en procesos celulares básicos. Dependiendo de la señal y del tipo

celular, estas proteínas pueden ser enzimas metabólicas, factores de transcripción, proteínas involucradas en la motilidad celular, canales iónicos, activadores de síntesis de DNA o proteínas involucradas en la muerte celular (Alberts *et al.*, 2008).

Una vez que el mensaje cumplió su propósito, la célula tiene que regular la concentración intracelular del segundo mensajero y eliminar el mensajero extracelular. Lo segundo lo hace mediante enzimas extracelulares que lo degraden o mediante la internalización del receptor unido al ligando, los cuales se degradan dentro de la célula (Karp, 2008).

1.1.1 Importancia del AMPc en la señalización intracelular

En la década de los 50, se sabía que hormonas como el glucagón y la epinefrina (adrenalina) podían inducir glucogenólisis (rompimiento del glucógeno en moléculas de glucosa), pero no se sabía cuál era el mecanismo (Beavo & Brunton, 2002). En esa época, Earl Sutherland trabajaba como postdoc en el laboratorio del Dr. Cori, donde realizaba ensayos de la activación hormonal de la glucógeno fosforilasa en rebanadas de hígado de perro.

Durante sus ensayos se dio cuenta que la activación e inactivación de la fosforilasa iban acompañadas de la adición de un grupo fosfato a la enzima y de la liberación de fosfato inorgánico, respectivamente (Beavo & Brunton, 2002). En trabajos posteriores, Sutherland y sus colaboradores, hicieron ensayos similares pero en homogenados de células y concluyeron que la activación de la glucogenólisis por epinefrina sucedía al igual que en células intactas.

Asimismo, cuando separaban los homogenados en dos fases (membranas y sobrenadante); observaban, al estimular con epinefrina, la producción de un factor en la fracción correspondiente a la membrana celular y que este factor estimulaba a la fosforilasa. En cambio, en la fracción del sobrenadante la hormona no tenía efecto alguno. Poco después, aislaron este factor, que resultó ser el AMPc. Con su descubrimiento nació el concepto de “segundo mensajero” y con ello el paradigma de la señalización intracelular (Beavo & Brunton, 2002; Hurley, 2003).

Han pasado casi 60 años desde entonces y la señalización celular mediada por AMPc se ha descrito en múltiples organismos, desde bacterias hasta mamíferos (Tresguerres *et al.*, 2011). Este segundo mensajero interviene en diversos procesos fisiológicos, que van desde el metabolismo (degradación del glucógeno), la percepción de olores, la respuesta inmune, el

aprendizaje y la memoria en el cerebro, así como el control del ritmo cardíaco y la toma de agua en el estómago y el riñón (Cheng *et al.*, 2008).

A nivel celular, el AMPc, juega un papel fundamental en prácticamente todas las funciones conocidas: como la regulación del metabolismo celular, la expresión génica, transporte de iones a través de membranas, regulación del pH citosólico y secreción. También, participa en procesos totalmente opuestos entre ellos, como la apoptosis y la división celular (Tresguerres *et al.*, 2011). Para que todos estos procesos sucedan de manera simultánea en una célula, se necesita de una localización espacio-temporal exacta y separada para cada proceso (Zaccolo *et al.*, 2002; Tengholm, 2007).

Actualmente, se sabe que las vías de señalización del AMPc se compartimentalizan dentro de la célula formando complejos macromoleculares en lugares específicos, llamados microdominios (Zaccolo & Pozzan, 2002; Hunyady *et al.*, 2012). Estos complejos macromoleculares están formados por las proteínas que se encargan de la síntesis de AMPc (adenilato ciclasas, AC), su degradación (fosfodiesterasas, PDE) y por alguna de las proteínas blanco del AMPc como pueden ser las cinasas dependientes de AMPc (PKA), las proteínas dependientes de AMPc que intercambia nucleótidos de guanina en las proteínas G pequeñas (el acrónimo de esta proteína es EPAC), los canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (HCN y CNG) y factores de transcripción como CAP (Edwards *et al.*, 2012). Todas las proteínas blanco de AMPc (efectoras) poseen al menos un dominio que interacciona con el AMPc.

1.2. Dominios conservados que coordinan NMPc.

Al momento se han identificado dos dominios conservados que interaccionan con nucleótidos cíclicos: GAF y CNDB (Bridges *et al.*, 2005). En ambos dominios la unión de nucleótidos cíclicos altera su estructura tridimensional, y este cambio funciona como un “switch” molecular para regular la actividad de las proteínas con estos dominios. El primer dominio, GAF, se encuentra en algunas subfamilias de PDEs y las ACs de algunas bacterias, entre otras proteínas (Martínez *et al.*, 2010). El segundo, el cual es tema de este trabajo, es el dominio de unión a nucleótidos cíclicos, CNBD.

1.2.1. GAF

El dominio GAF es un dominio de unión a moléculas pequeñas. Es uno de los dominios más numerosos y se encuentra en diversas proteínas de procariontes y eucariontes (Schultz *et al.*, 1998; Anantharaman *et al.*, 2001). El acrónimo GAF proviene de las tres primeras proteínas caracterizadas que poseen este dominio (Aravind & Ponting, 1997): una PDE de mamífero que une GMPC, las adenilato ciclasas de la cianobacteria *Anabaena sp.* y el activador transcripcional de la formato hidrógeno liasa Fh1A de *Escherichia coli*.

La mayoría de las proteínas que poseen dominios GAF participan en el proceso de transducción de señales. En general, poseen uno o dos dominios GAF en *tándem*, incluso se han encontrado hasta seis dominios GAF dentro de una sola proteína. Estos dominios, al ser activados por su ligando, inducen un cambio en su estructura o promueven su dimerización (Schultz, 2009).

La primera estructura reportada de un dominio GAF fue la de la proteína de función desconocida YKG9 presente en *Saccharomyces cerevisiae* (Ho *et al.*, 2000). Esta proteína no se encuentra regulada por GMPC, y tampoco lo puede coordinar. A pesar de ello, su topología general y su secuencia de aminoácidos es similar a la de los dominios GAF que sí unen nucleótidos cíclicos, como el que se encuentra en la PDE2 de ratón (Martínez *et al.*, 2002).

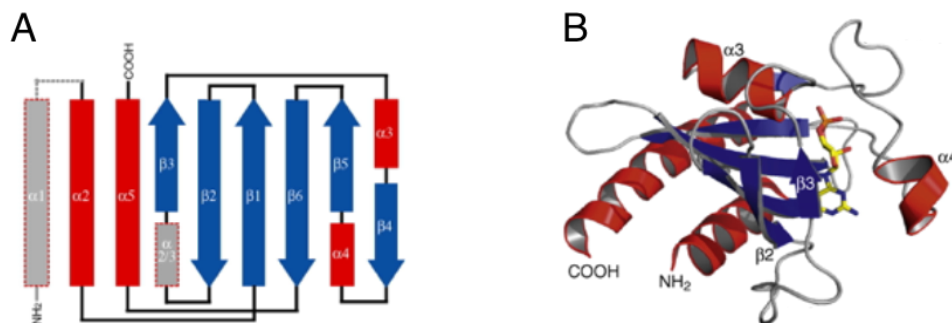


Figura 2. Estructura de los dominios GAF. En el panel A se muestra la topología general del dominio GAF. Todas las estructuras reportadas de los dominios GAF que unen AMPc están formadas por una lámina β (azul) formada por seis hojas antiparalelas con un orden de 3-2-1-6-5-4 y cuatro hélices α (rojo). En algunos dominios se pueden observar otras hélices α (gris) pero estas no son esenciales para su plegamiento ni para la estabilidad del dominio. En el panel B se observa la estructura tridimensional en forma de listón del dominio GAF de la PDE2A unida a GMPC, las hélices α están en rojo, las hojas β en azul, las asas en gris y en amarillo los carbonos del GMPC (Tomado de Heikaus, Pandit & Klevit, 2009)

Todas las estructuras cristalográficas (Heikaus *et al.*, 2009) hasta ahora reportadas de dominios GAF funcionales, es decir, que sí unen nucleótidos cíclicos, están formadas por una lámina β compuesta por seis hebras β antiparalelas y por cuatro hélices α (figura 2A).

La lámina β divide al dominio en dos, de un lado se encuentran las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 5$ (corresponden al extremo amino y carboxilo del dominio, respectivamente) y del otro las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ (figura 2B). Entre la lámina β y las hélices $\alpha 3$ y $\alpha 4$ se forma una cavidad donde se une el nucleótido cíclico. La unión del nucleótido cíclico disminuye la flexibilidad, curvando la lámina β hacia el NMPc en una posición fija, asimismo, estabiliza la hélice $\alpha 4$ y las asas a su alrededor (Heikaus *et al.*, 2009).

1.2.2. CNBD

Los dominios de unión a nucleótidos cíclicos CNBD son dominios proteicos conservados en organismos procariontes y eucariontes. Constan de aproximadamente 120 residuos (Dremier *et al.*, 2003). Han evolucionado de tal manera que responden con un cambio conformacional inducido por la unión de los NMPc. La estructura general de los CNBDs (figura 3A) consiste en una hélice α en el amino terminal llamada hélice A, seguida por una estructura sándwich β formada por 8 hojas β antiparalelas, entre las hojas $\beta 6$ y $\beta 7$ existe una pequeña hélice α denominada como hélice P. Finalmente, en la porción carboxilo terminal, se encuentran la hélice αB (llamada bisagra) y una región denominada tapa, que en la mayoría de los CNBD es una hélice αC (Zagotta *et al.*, 2003; Berman *et al.*, 2005).

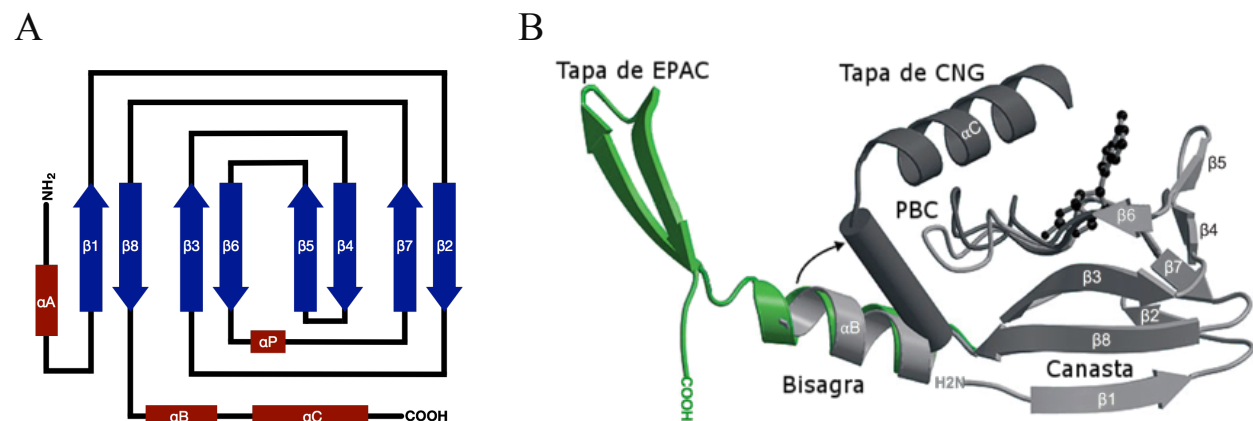


Figura 3. Estructura de los dominios CNBD. En el panel A se muestra la topología general de los CNBDs de canales iónicos, es importante mencionar que la hélice αC en EPAC no está presente; esta región corresponde a la tapa y en EPAC está formada por una lámina β . En el panel B se muestra la estructura tridimensional de los CNBDs de EPAC y del canal CNG. El CNBD de EPAC se muestra en color verde y representa su conformación en su estado libre de AMPc. El CNBD del canal CNG unido a AMPc (gris oscuro) y libre de AMPc (gris claro) se encuentran superpuestos. El CNBD de EPAC es muy parecido al del canal CNG a excepción de la tapa, ya que difiere totalmente en estructura y secuencia (Modificado de Zagotta *et al.*, 2003 y Rehmann *et al.*, 2006).

El sándwich β sirve como una canasta donde se deposita el NMPc y posee una región muy importante denominada casete de unión a fosfato PBC (por las siglas en inglés de “Phosphate Binding Cassette”) que se encuentra entre las hebras β -6 y β -7. El PBC posee un residuo de arginina muy conservado, el cual se encarga de unir al fosfato a través de su grupo guanidino (Berman *et al.*, 2005). La hélice α B, aunque presenta variaciones en longitud, se encuentra altamente conservada en todos los CNBDs y sufre un cambio conformacional cuando interacciona con el NMPc.

La tapa es la estructura menos conservada en secuencia y en estructura dentro de los CNBDs. En la figura 3B se muestran las estructuras sobrepuestas de los CNBDs de EPAC y la del canal CNG. Se puede observar claramente que la tapa es totalmente diferente en estos CNBDs, ya que en EPAC está conformada por hojas β plegadas y en el canal CNG es una hélice α , la cual recibe el nombre de hélice α C (Rehmann *et al.*, 2006). A pesar de estas diferencias, la región de la tapa en los CNBDs conserva su función de interactuar con la base nitrogenada del nucleótido cíclico (Dremier *et al.*, 2003; Rehmann *et al.*, 2007).

Este dominio se encuentra en diversas proteínas y se encarga de regular su función. Las principales son PKA, EPAC, los canales iónicos HCN y CNG, además del factor de transcripción CAP y la recientemente descubierta proteína CRIS (Rehmann *et al.*, 2007; Krähling *et al.*, 2013).

1.2.2.1. CAP

La proteína activadora por catabolitos (CAP) es un activador transcripcional en procariontes que regula cientos de unidades transcripcionales a través de su respuesta a las fluctuaciones de AMPc intracelulares. CAP es una proteína de aproximadamente 22.5 kDa y actúa como homodímero (McKay & Steitz, 1981).

En el amino terminal de cada subunidad se encuentra el CNBD, cuya hélice C se encarga de formar el homodímero a través de una hélice superenrollada (“coiled-coil”). En el C-terminal se encuentra un motivo hélice-giro-hélice (“helix-turn-helix”) el cual forma parte del dominio de unión a DNA.

La unión de AMPc al CNBD genera un cambio conformacional en el homodímero, lo que le permite interactuar fuerte y específicamente con ciertas secuencias de DNA que funcionan

como promotores (Popovych *et al.*, 2009). Dentro de las proteínas que contienen CNBDs, CAP fue la primera proteína cuya estructura tridimensional se determinó por cristalografía (McKay & Steitz, 1981).

1.2.2.2. PKA

Es una cinasa de serina y treonina que se activa mediante la unión de cuatro moléculas de AMPc. Está formada por cuatro subunidades: dos subunidades catabólicas (C2) unidas a un dímero de la subunidad regulatoria (R2).

Las subunidades regulatorias tienen en su amino terminal un dominio DD (“dimerization and docking”), el cual se encarga de la formación del dímero y su unión con las proteínas AKAP. Seguido del dominio DD, se encuentra una región flexible que se une al sitio activo de la subunidad catalítica y funge como su pseudosustrato.

En el carboxilo terminal se encuentran dos CNBDs en tándem con un tamaño aproximado de 14 kDa cada uno (Bubis *et al.*, 1988). En ausencia de AMPc, la subunidad regulatoria está unida con una subunidad catalítica, y de esta manera la enzima se mantiene en forma inactiva. Al ocuparse los dos sitios de unión a AMPc de cada subunidad regulatoria (en total se unen cuatro AMPc, uno en cada CNBD), la holoenzima (R2C2) se disocia y por lo tanto la subunidades catalíticas se activan.

1.2.2.3. Canales iónicos CNG y HCN

Los canales CNG son los canales activados por nucleótidos cíclicos. Su función se encuentra relacionada principalmente con la transducción de estímulos olfativos y visuales. Los HCN son canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos. La unión del NMPc provoca un cambio en la dependencia de voltaje del canal, por lo que se abre a voltajes más despolarizantes. Son conocidos como canales marcapasos ya que se encargan de regular la tasa de disparo de los potenciales de acción en las células cardíacas y neuronales (Zheng & Trudeau, 2015).

Ambos pertenecen a la superfamilia de canales de K⁺ regulados por voltaje y son estructuralmente similares. Están formados por cuatro subunidades, las cuales poseen seis segmentos transmembranales (S1-S6). Entre el segmento 5 y 6 se encuentra la región que forma el poro. El segmento 4 posee varios aminoácidos cargados positivamente que funcionan como

sensor de voltaje, no obstante la apertura de los canales CNG no es voltaje dependiente. Los extremos amino y carboxilo terminales de cada subunidad se encuentran del lado citosólico. En el extremo carboxilo se encuentra el CNBD, el cual se une al resto del canal mediante una región denominada C-linker que está compuesta por 6 hélices α (Craven & Zagotta, 2006).

Cuando el AMPc se une al CNBD se estabilizan las hélices C y F' del CNBD y del C-linker, respectivamente (figura 4). Al mismo tiempo la hélice C se mueve hacia el CNBD y se acerca a la hélice F', esto genera un cambio conformacional que se propaga a través del C-linker (figura 4). Este movimiento estabiliza la conformación abierta del canal, por lo que se incrementa la probabilidad de apertura (Puljung & Zagotta, 2013).

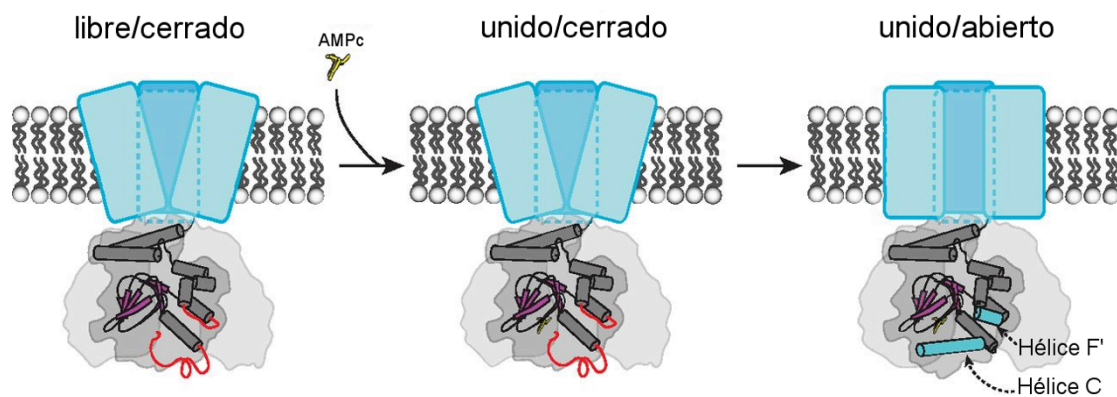


Figura 4. Modelo del cambio conformacional en la apertura de los canales regulados por nucleótidos cíclicos. Durante la conformación cerrada del canal y sin AMPc, las hélices C y F' se encuentran en una conformación no helicoidal, la cual está representada como asas de color rojo. El AMPc se une al β -sándwich del CNBD (estructura morada) del canal cuando éste está cerrado. Después de la unión del agonista al CNBD, este interactúa con la hélice C y la estabiliza, a su vez esta hélice se acerca a la hélice F' estabilizando su estructura helicoidal. Esta estabilización es la que está acoplada a la apertura del canal (Modificado de Puljung & Zagotta, 2013).

1.2.2.4. EPAC

EPAC viene del acrónimo en inglés “Exchange Protein Activated by cAMP”. Es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) dependiente de AMPc, es decir, intercambia GDP por GTP cuando el AMPc se une, activando así a las proteínas G pequeñas Rap1 y Rap2 (Dremler *et al.*, 2003). En el extremo amino se encuentra la región regulatoria que consta de un CNBD y de la región DEP (especializada en anclar la proteína a la membrana), mientras que en el carboxilo terminal se encuentra la región catalítica (de Rooij *et al.*, 1998).

Hasta el momento se conocen dos variantes de EPAC: EPAC I y EPAC II. La principal diferencia entre las dos es que en la primera hay un solo CNBD, mientras que la segunda posee

dos CNBD (A y B). Sin embargo, el que se encarga de la interacción específica con el AMPc es el CNBD B (Rehmann *et al.*, 2006).

1.2.2.5. CRIS

Recientemente, se descubrió en las células precursoras de los espermatozoides una nueva proteína que posee un dominio CNBD (Krähling *et al.*, 2013). A esta proteína se le llamó CRIS (receptor de AMPc involucrado en el funcionamiento del espermatozoide), su función no está totalmente clara pero se cree que tiene un papel importante durante la espermiogénesis, ya que se expresa únicamente en los espermátocitos secundarios y espermátidas redondas, pero no en los espermatozoides maduros.

Los ratones nulos homocigóticos para CRIS presentan dos fenotipos: uno infértil y el otro subfértil. Los individuos infértiles sufren un arresto en su espermatogénesis, mientras que los subfértils continúan con el proceso y contienen espermatozoides en sus epidídimos. A pesar de ello, estos espermatozoides tienen defectos en su movilidad debido a problemas en la regulación del Ca^{2+}_i y en la curvatura del flagelo. Hasta el momento, no se conoce el rol que juega el AMPc en la regulación de la proteína CRIS.

1.3. Posibles dominios CNBDs encontrados por análisis bioinformático

Kannan y colaboradores., en el año 2007, buscaron CNBDs en secuencias de proteínas en los bancos de datos del NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) y GOS (“Global Ocean Sampling expedition”). Encontraron distintas proteínas que poseen este dominio tanto en procariontes como en eucariontes, de las cuales la gran mayoría no se han caracterizado (Kannan *et al.*, 2007).

La presencia de un CNBD predicho por análisis bioinformático no significa necesariamente que la actividad de la proteína que lo posee sea modulada por NMPc. Se conoce la existencia de proteínas como los factores transcripcionales procariontes CooA y CprK y los canales KCNH, que a pesar de poseer un CNBD en su secuencia, no responden a NMPc (Kannan *et al.*, 2007; Brelidze *et al.*, 2009).

Los factores transcripcionales CooA y CprK tienen una estructura y función muy parecida a CAP. Sin embargo, en lugar del AMPc, otro tipo de moléculas interacciona con el dominio equivalente al CNBD en estas proteínas. En ambos factores de transcripción, el CNBD

no posee un PBC canónico. Además, el residuo de arginina importante para la interacción con el fosfato del nucleótido cíclico está ausente (Kannan *et al.*, 2007).

En el caso de CoxA, el dominio equivalente al CNBD se une a un grupo hemo (Lanzilotta *et al.*, 2000). Este grupo hemo es el que se encarga de detectar al monóxido de carbono (CO), el cual induce un cambio conformacional que activa a la proteína (Lanzilotta *et al.*, 2000; Borjigin *et al.*, 2007; Won *et al.*, 2009). Este factor transcripcional se encarga de regular positivamente la expresión de genes involucrados en la oxidación del CO para obtener energía en ambientes anaeróbicos.

El ligando funcional del factor transcripcional CprK es el ácido orto-clorofenolacético (OCPA). Este funciona como activador de la proteína promoviendo así la transcripción de genes involucrados en la halorespiración (Joyce *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2008; Kemp *et al.*, 2013).

Recientemente se reportó la estructura cristalográfica del CNBD del canal KCNH del pez cebra (zELK) (Brelidze *et al.*, 2012). Este CNBD no posee una canasta adecuada para la unión del NMPc. De hecho, el sitio se encuentra ocupado por una pequeña hebra β del propio canal que podría funcionar, aparentemente, como un ligando intrínseco. De acuerdo con esta idea, las mutaciones en esta hebra β producen un cambio en la actividad del canal, similar al que produce el AMPc en los canales HCN (Brelidze *et al.*, 2012). Debido a la carencia definitiva de interacción del CNBD de zELK con los NMPc, a este dominio se le renombró CNBHD (dominio homólogo a CNBD).

Como se mencionó anteriormente, la presencia de un CNBD predicho por análisis bioinformático no significa necesariamente que el dominio sea afín a nucleótidos cíclicos. Para confirmar su interacción, es necesario realizar una caracterización bioquímica mediante un ensayo de unión a NMPc.

2. ANTECEDENTES

Desde el descubrimiento del AMPc se han desarrollado diferentes metodologías para caracterizar su unión con sus proteínas efectoras. Debido a la importancia del AMPc como segundo mensajero y la existencia de muchas proteínas con un dominio CNBD predicho por secuencia, es imperativo obtener un método rápido y confiable para medir la interacción entre el AMPc y el posible CNBD funcional. A continuación, se describirán brevemente algunos de los ensayos de unión empleados en la investigación de los CNBDs.

2.1. Métodos para estudiar la interacción molecular entre los CNBD y el AMPc

2.1.1. Utilizando AMPc marcado

2.1.1.1. Separación mecánica

En estos ensayos el AMPc puede estar marcado mediante radioactividad o una molécula fluorescente. Existen varias maneras de realizar este ensayo, pero básicamente se necesita adsorber la proteína blanco de interés a microesferas de sefarosa. Esto puede ser a través de una cola de histidinas en la proteína y su unión a la resina de Ni^{2+} o mediante la proteína de fusión glutatión transferasa unida a la proteína de interés y su unión a microesferas de sefarosa con glutatión (Dremier *et al.*, 2003). Cuando la proteína ya esté adsorbida a las microesferas, se le agrega una cantidad conocida del AMPc marcado (8-fluo-AMPc o $[\text{}^3\text{H}]$ -AMPc, por ejemplo). Una vez añadido, se centrifuga la muestra y se cuantifica el AMPc marcado que está en el sobrenadante y el que está unido a la proteína.

Además de lo laborioso que es el método, se han encontrado resultados contradictorios en la literatura. Esto puede deberse a que este tipo de métodos no sirve para CNBDs con una rápida disociación (Dremier *et al.*, 2003).

2.1.1.2. Anisotropía

La aplicación de la anisotropía de fluorescencia en los ensayos de unión de AMPc se basa en la disminución de la rotación molecular del análogo fluorescente de AMPc al unirse con una molécula de mayor tamaño, ya sea el CNBD de la proteína o la proteína completa (Xu *et al.*, 2010).

Las moléculas del análogo fluorescente de AMPc dentro de una solución se encuentran orientadas aleatoriamente. Si se incidieran con una luz polarizada, las moléculas que se excitarían serían las que se encontraran orientadas adecuadamente con respecto a esta luz. Durante su estado excitado, las moléculas pueden cambiar su orientación libremente antes de emitir los fotones, por lo que el grado de polarización de la luz emitida cambiaría (Lakowicz, 2002). Este cambio en el grado de polarización entre la luz de excitación y la fluorescencia emitida es lo que se conoce como anisotropía de fluorescencia (Lakowicz, 2006). El cambio depende de la velocidad de rotación de la molécula durante su estado excitado, el cual se ve afectado por muchos factores, como el tamaño de la molécula, su forma, la viscosidad del medio y la temperatura. Por ello, cuando el análogo fluorescente se une al CNBD (una molécula de mayor tamaño), su velocidad de rotación cambia (se hace más lenta), llevando a una reducción en la despolarización y por lo tanto a un valor de anisotropía mayor.

El uso de esta técnica puede dar información incluso cuando los resultados de otras técnicas no fueron concluyentes. Las desventajas son que se necesita tener un espectrofluorómetro con polarizadores (lo cual no es muy común, ya que su precio es elevado), la intensidad de la señal de fluorescencia se ve disminuida debido al uso de luz polarizada y se necesita tener mucho cuidado en hacer los ensayos ya que cualquier contaminación en las soluciones o una purificación deficiente de la proteína podrían llevar a artefactos, debido a que el análogo fluorescente podría unirse a otras moléculas que no son las que se quieren probar en el ensayo.

2.1.1.3. Fluoróforos sensibles al ambiente

Otra forma de medir la interacción entre un CNBD y el AMPc es utilizando análogos fluorescentes del AMPc sensibles al ambiente como el 8-NBD-AMPc (Cukkemane *et al.*, 2007; Brelidze *et al.*, 2009; Tsalkova *et al.*, 2012).

El NBD (nitrobenzoxadiazol) es un fluoróforo sensible al ambiente que incrementa su fluorescencia cuando se encuentra en un ambiente hidrofóbico. Esta característica lo convierte en una excelente herramienta para determinar cambios conformacionales y uniones específicas entre proteínas. Para el caso del análogo de AMPc, el NBD se encuentra unido al C8 de la adenina y es moderadamente fluorescente en solución, pero cuando se une al CNBD su fluorescencia incrementa drásticamente.

2.1.2. Utilizando AMPc inmovilizado

2.1.2.1. Resonancia plasmónica superficial (“Surface Plasmon Resonance”)

Este método se basa en la determinación óptica del ángulo de refracción de una muestra y sus cambios asociados a la unión de la proteína al AMPc, el cual se encuentra inmovilizado sobre una placa de metal (generalmente oro) que está en la interfase de dos materiales de diferente índice de refracción (Visser *et al.*, 2007).

Se utiliza por lo general una luz p-polarizada (su componente electromagnético está en el mismo plano que el de la incidencia) que pasa por un prisma, incide sobre la superficie de metal y se refleja hacia el detector; esto se realiza con varios ángulos de incidencia de la luz (Stahelin, 2013). Existe un ángulo crítico (llamado ángulo de resonancia) donde no toda la luz se refleja (se percibe como un decremento en la intensidad de la luz que llega al detector). En este ángulo la luz es absorbida por los electrones del metal y hace que estos resuenen; estos electrones resonantes se conocen como plasmones. Cualquier pequeño cambio en la interfase hace que este ángulo cambie, lo que permite hacer mediciones precisas y en tiempo real de las interacciones moleculares sin la necesidad de marcar a ninguno de los participantes del ensayo (Rasooly & Herold, 2009). La desventaja de este método es que es tan sensible que cualquier perturbación en la interfase genera un cambio en el ángulo, por lo que se necesita una muestra muy pura.

2.1.3. Utilizando AMPc no marcado

2.1.3.1. Calorimetría isotérmica de titulación

Esta técnica es la única que puede medir directamente los parámetros termodinámicos (entalpía, energía libre de Gibbs y entropía) de la unión entre una proteína y su ligando. Esta técnica se basa en la formación y ruptura de enlaces entre la proteína y la solución cuando existe un cambio conformacional debido a la adición del ligando. Esto se mide mediante la cantidad de energía a lo largo del tiempo que se necesita para mantener constante la temperatura entre la muestra y una celda de referencia.

Para determinar la unión de un CNBD y el AMPc, la muestra contiene el CNBD y se van inyectando, constantemente y poco a poco, concentraciones conocidas de AMPc hasta llegar a la saturación (Cukkemane *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2010). De esta manera, se pueden obtener curvas

de unión graficando la cantidad de energía/mol de AMPc y la estequiometría AMPc:CNBD usada. La principal desventaja de este método es que se necesita una proteína muy pura ($\geq 90\%$) y cuidar que las soluciones no estén contaminadas con algún otro reactivo.

2.1.3.2. Espectrofotometría de dicroísmo circular

El dicroísmo circular se refiere a la absorción diferencial de una molécula quiral cuando se incide con una luz circularmente polarizada hacia la derecha y hacia la izquierda; esta diferencia de polarización se da en grados de elipticidad (Kelly *et al.*, 2005). El dicroísmo circular se utiliza ampliamente en la determinación de la estructura secundaria de las proteínas, ya que dependiendo del grado de torsión del enlace peptídico (que funge como cromóforo), se obtiene un ángulo de elipticidad, característico de cada estructura secundaria, en el rango de 160-260 nm de longitud de onda. Además, si se obtiene el espectro de dicroísmo circular en el rango de 260-320 nm este reflejará el ambiente en el que se encuentran las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos, lo que nos brinda información acerca de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas (Kelly & Price, 2000).

Esta técnica sirve para determinar la unión del AMPc a su CNBD debido a que la unión implica un cambio conformacional en el CNBD (Cukkemane *et al.*, 2007; Brelidze *et al.*, 2009; Puljung & Zagotta, 2013). Las desventajas de esta técnica es que se necesita tener una proteína con un grado de pureza mayor al 90 % y debe de estar en un amortiguador que no absorba luz en la región del espectro utilizada (se debe de evitar usar imidazol y ditiotreitol). Es decir, las condiciones fisicoquímicas en que se mide la unión, no necesariamente reflejan las condiciones fisiológicas en la que se da la interacción.

2.1.3.3. Espectrofluorometría del triptófano

En la literatura existen varios artículos donde comprueban la unión del AMPc con el CNBD midiendo la fluorescencia del triptófano en presencia y ausencia del nucleótido cíclico (Cukkemane *et al.*, 2007; Brelidze *et al.*, 2009). El triptófano es un aminoácido aromático, su grupo indol posee un pico de absorción a 278 nm y uno de emisión cercano a los 350 nm. Este fluoróforo se encuentra de forma natural dentro de las proteínas y puede servir como sensor de cambios conformacionales debido a que su fluorescencia se afecta fuertemente por la polaridad del solvente (Lakowicz, 2006; Nishigaki & Treviño, 2012).

Las desventajas de este método son la baja intensidad de fluorescencia del triptófano y la posible falta de este aminoácido en la región de interés de la proteína a estudiar. O en su defecto, su presencia en otras partes de la proteína (por lo que necesitaríamos mutar esos aminoácidos, lo cual podría afectar la estructura tridimensional de la proteína).

2.1.3.4. FRET entre proteínas fluorescentes

FRET

FRET (transferencia de energía de fluorescencia por resonancia de Förster) es un fenómeno cuántico que ocurre entre un fluoróforo donador en un estado electrónico excitado y un cromóforo o fluoróforo aceptor en su estado basal (Lakowicz, 2006). El resultado de la transferencia de energía se ve reflejado en la disminución de la eficiencia cuántica y en el decremento del tiempo de vida media del donador (por lo que disminuye su fluorescencia) y en el caso de que el aceptor sea también un fluoróforo este emitirá un fotón.

Aunque este fenómeno sucede si y sólo si el donador y el aceptor se encuentran lo suficientemente cerca ($\sim 0.5-10$ nm) la interacción no es colisional.

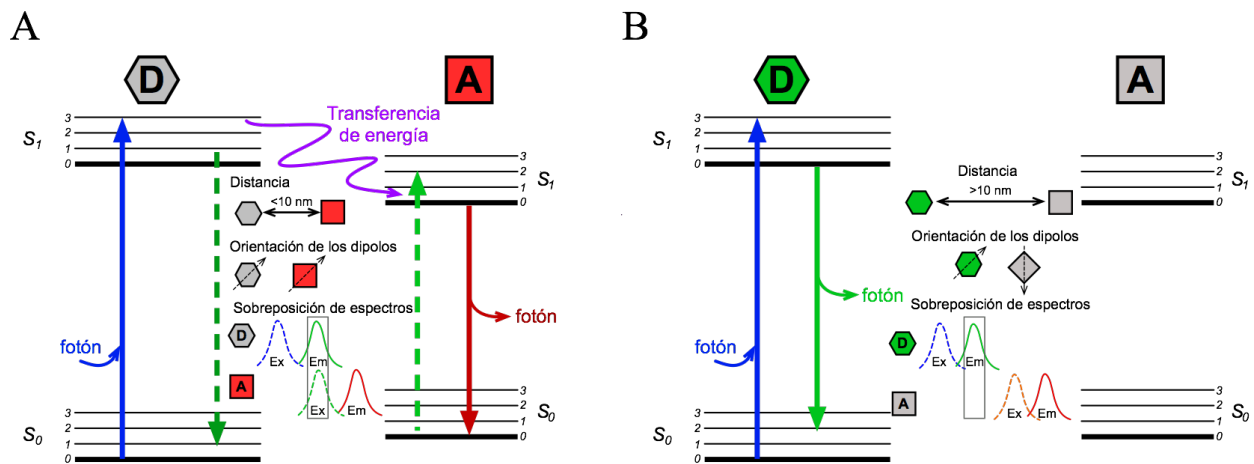


Figura 5. FRET y diagrama de Jablonski simplificado. Se representan los estados electrónicos basales (S_0) y excitados (S_1) junto con sus respectivos subniveles vibracionales de dos moléculas fluorescentes que representan al donador (D) y al aceptor (A) en un par FRET. En el panel A ocurre transferencia de energía después de que el donador absorbe un fotón que lo lleva a su estado excitado (flecha azul), el fluoróforo donador regresa a su estado basal sin emitir un fotón (línea punteada, verde oscuro) después de transferir su energía al aceptor. La molécula aceptora llega a su estado excitado sin absorber un fotón (línea punteada, verde claro) y regresa a su estado basal emitiendo un fotón de menor energía (línea roja). En este caso, los dos fluoróforos se encuentran a una distancia menor a 10 nm, sus dipolos son paralelos y existe una sobreposición del espectro de emisión del donador con el de excitación del aceptor. En el panel B, no hay transferencia de energía debido a que los dos fluoróforos están alejados uno del otro, sus dipolos no están orientados ni hay una sobreposición entre sus espectros.

El flujo de energía va de la molécula donadora hacia la aceptora y la transferencia de energía no es radiativa, es decir, la molécula donadora no emite fotones que son absorbidos por el aceptor (Piston & Kremers, 2007). En realidad, la transferencia de energía sucede mediante la interacción de los dipolos oscilatorios de las moléculas, por lo que estos deben de oscilar en las mismas frecuencias (Lakowicz, 2006; Clegg, 2009).

Debido a lo anterior, la sobreposición del espectro de emisión del donador con el espectro de excitación del aceptor y la orientación de los dipolos son, al igual que la distancia, requisitos fundamentales para que ocurra FRET (figura 5). Ya que este fenómeno depende fuertemente de la distancia entre el donador y el aceptor, se le ha utilizado como una regla molecular y como una herramienta para medir la interacción entre dos moléculas.

Métodos para medir FRET

1) Cambios en la fluorescencia del donador. Este método es el más sencillo de todos, la emisión del donador se mide cuando el donador es excitado a una longitud de onda específica; si el aceptor es una molécula fluorescente también se puede medir su fluorescencia al mismo tiempo que la del donador y se puede obtener un cociente (Vogel *et al.*, 2006). A pesar de que es muy sencillo, tiene varias desventajas, la principal se debe a la sobreposición de los espectros de los dos fluoróforos, ya que podría haber contaminación del aceptor en el canal de donador y viceversa. Además, el aceptor podría ser excitado por la luz de excitación, lo que generaría señal de fluorescencia en el canal del aceptor a pesar de que no hay FRET.

2) Cambios en el tiempo de vida media. El tiempo de vida media de un fluoróforo es el tiempo promedio que pasa un fluoróforo en su estado excitado antes de emitir un fotón y regresar a su estado basal (Piston & Kremers, 2007). Los tiempos de vida media de los fluoróforos van desde cientos de picosegundos a nanosegundos, por ello se necesita de un equipo especializado que pueda medirlo (Lakowicz, 2006). Existen dos formas de medir el tiempo de vida media, la más sencilla de explicar es en el dominio de tiempo, ya que literalmente se mide el tiempo que tarda en emitir el fotón. La segunda forma es en el dominio de frecuencia, para ello se excita al fluoróforo con una luz con frecuencia modulada, como los fluoróforos tienen un tiempo de vida va a ocurrir un retraso cuando emitan fotones, por lo que el tiempo de vida se determina gracias a ese desfaseamiento.

3) Fotoblanqueo del aceptor. En este método se mide la fluorescencia del donador antes y después de fotoblanquear al aceptor. Una de las ventajas de este método es que la misma muestra es su propio control, ya que al fotoblanquear se destruye físicamente el fluoróforo por lo que se obtiene la condición de ausencia del aceptor (Piston & Kremers, 2007). Las desventajas de este método son que no puedes usar la misma muestra más de una vez y que al fotoblanquear al aceptor se puede dañar al donador por la misma incidencia de luz o la creación de especies reactivas de oxígeno.

4) Cambio en el espectro de emisión. Es una variante del método de medir el cambio de la intensidad del donador, sólo que en vez de tomar sólo un canal, se toma completo el espectro de emisión del donador y aceptor (Piston & Kremers, 2007).

Proteínas fluorescentes

La primera proteína fluorescente se descubrió en 1961 por el Dr. Osamu Shimomura, la llamó proteína verde fluorescente (por sus siglas en inglés, GFP) y fue aislada de la medusa *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962). Pasaron casi 20 años para que se identificara el cromóforo (Shimomura, 1979) y una década más para que se clonara y se secuenciara el gen (Prasher *et al.*, 1992). Este último evento fue crucial para que se empezaran a utilizar como una herramienta en el quehacer científico, ya que dos años más tarde se publicaron los trabajos de Chalfie e Inouye donde lograron expresar a la GFP en otros organismos (Chalfie *et al.*, 1994; Inouye & Tsuji, 1994) y la utilizaron como marcador de expresión génica (Chalfie *et al.*, 1994).

Gracias a la producción de GFP recombinante se pudo obtener, dos años después, su estructura cristalográfica (Ormö *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996). También se empezaron a hacer mutantes de la GFP para mejorar su estabilidad, evitar la formación de dímeros, acelerar el proceso de maduración del cromóforo y obtener una amplia gama de colores (Heim *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1995; Heim & Tsien, 1996; Tsien, 1998, 2009; Shaner *et al.*, 2004; Ai & Campbell, 2007; Day & Davidson, 2009). La cual se amplió aún más con el descubrimiento, en otros organismos, de proteínas fluorescentes (FPs) con emisión hacia el rojo (Matz *et al.*, 1999; Wall *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 2002; Shu *et al.*, 2006).

Las proteínas fluorescentes están formadas por aproximadamente 230 aminoácidos y tienen una estructura de barril β prácticamente cilíndrica compuesta por 11 hojas β . Poseen una hélice α que cruza por dentro del barril y tres hélices α cortas que tapan la parte de arriba del

cilindro (Tsien, 2009). La GFP silvestre (wtGFP) forma homodímeros débiles a altas concentraciones ($K_d=110 \mu\text{M}$), pero la mayoría de las variantes que se usan en la actualidad son monoméricas ya que tienen una mutación importante, A206K, que evita la dimerización ($K_d=74 \text{ mM}$) (Tsien, 1998).

Dentro del barril β se encuentra el cromóforo, el cual es parte integral de la proteína. Está formado por tres residuos de aminoácidos (S65-Y66-G67 en GFP) que sufren modificaciones postraduccionales en un proceso llamado maduración (Shimomura, 2009; Tsien, 2009). Una de las características particulares de la wtGFP es que tiene dos picos de absorción (395 nm y 475 nm). Cuando se excita el primer pico, la emisión máxima es en 508 nm y cuando se excita el segundo, el pico de emisión se encuentra en 503 nm (prácticamente un mismo pico de emisión) (Tsien, 1998). Dentro de las variantes de las proteínas fluorescentes cabe hacer incapié en la CFP y Tomate, las cuales son utilizadas como fluoróforos en este trabajo.

CFP

La CFP (proteína cian fluorescente) es una variante de la wtGFP de *A. victoria*, tiene una emisión azul-verde (cian) ya que tiene las sustituciones S65T y Y66W en el cromóforo. Esta última es la responsable de que se forme un cromóforo diferente, ya que el triptófano tiene un grupo indol en vez del fenol de la tirosina (Cubitt et al., 1995; Tsien, 1998).

Como el grupo indol es más grande que el fenol, se necesitaron realizar mutaciones adicionales (F64L, N146I, M153T, V163A) para recobrar el brillo de la proteína. Fue una de las primeras variantes en ser desarrolladas y se usó ampliamente, junto con YFP (del inglés, proteína amarilla fluorescente), en ensayos tipo FRET (Miyawaki *et al.*, 1999, 2003; Miyawaki & Tsien, 2000; Nikolaev *et al.*, 2004; Ponsioen *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 2007; Niino *et al.*, 2010).

tdTomate

Es una variante de la proteína fluorescente drFP583 (mejor conocida como DsRed) aislada del coral *Discosoma sp.* (Matz et al., 1999). Aunque sólo conserva un 25% de identidad de secuencia con la wtGFP, tiene una estructura de barril β formado por 11 hojas β al igual que ésta. Además, dos de los aminoácidos que forman el cromóforo (Tyr y Gly) son los mismos en ambas FPs. La proteína DsRed forma homotetrámeros obligados (Baird *et al.*, 2000; Wall *et al.*, 2000), por lo que se le sometió a varias rondas de mutagénesis para lograr obtener variantes

diméricas y monoméricas que conservaran su fluorescencia (Campbell et al., 2002; Shaner et al., 2004).

Una de estas variantes es tdTomato, la cual está formada por dos proteínas rojo fluorescente en tándem unidas por un linker de 12 aminoácidos (Shaner et al., 2004). Su cromóforo está formado por los aminoácidos MYG, este también pasa por un proceso de maduración dependiente de oxígeno. A pesar de estar formada por dos FPs, funciona como si fuera un solo fluoróforo (se le considera un pseudomonómero). Esta proteína es la más brillante de todas las variantes de DsRed, por lo que se ha usado como aceptor en sensores tipo FRET (Ai et al., 2008; van der Krogt et al., 2008; Ding et al., 2011; Gruenwald et al., 2012).

Ensayo de unión utilizando FRET intramolecular

Recientemente se comprobó, usando FRET, la funcionalidad del CNBD de la proteína CRIS utilizando como fluoróforos dos proteínas fluorescentes (Krähling et al., 2013). Para ello, se elaboró una proteína quimérica donde las proteínas fluorescentes cerúleo y citrina están unidas al amino y carboxilo terminal del CNBD, respectivamente (a este tipo de construcción se le denomina tipo sándwich, ya que el dominio de interés se encuentra localizado entre las proteínas fluorescentes). En ausencia de AMPc, las dos proteínas fluorescentes se encontraban muy cerca por lo que al excitar a cerúleo se observa la fluorescencia de citrina, es decir ocurría transferencia de energía. Cuando se añadía AMPc, los amino y carboxilo terminal se alejaban, evitando la transferencia de energía por lo que se incrementó la fluorescencia del donador (cerúleo).

Las desventajas de utilizar un diseño de FRET intramolecular radican en que incluso en ausencia de ligando hay un porcentaje basal de transferencia de energía. Esto trae como consecuencia la disminución del rango dinámico de la prueba.

Además, el diseño de la proteína quimérica se complica ya que se vuelve indispensable que el cambio conformacional inducido por el NMPc disminuya o aumente de manera sustancial la distancia entre las proteínas fluorescentes para que el cambio de fluorescencia sea lo suficientemente grande y poder diferenciar entre los estados unido y libre de AMPc. Por ello, para nuestro proyecto, decidimos utilizar un diseño basado en FRET intermolecular entre un CNBD marcado con una proteína fluorescente y un análogo fluorescente de AMPc.

3. JUSTIFICACIÓN

Existe una extensa lista de proteínas que, al menos en secuencia, poseen un CNBD pero no han sido totalmente caracterizadas. La existencia de nuevas proteínas que pudieran ser reguladas por AMPc llevaría a una mejor comprensión de los mecanismos de señalización y homeostasis celular. Es por ello que en este trabajo nos propusimos desarrollar un nuevo método para determinar la unión entre AMPc y los CNBD de manera rápida, sencilla y eficiente.

4. HIPÓTESIS

Es posible crear un ensayo de unión para AMPc basado en FRET intermolecular utilizando como fluoróforos un análogo fluorescente de AMPc y una proteína quimérica formada por un CNBD unido a una proteína fluorescente.

5. OBJETIVO

5.1. Objetivo general

Desarrollar un método sencillo para determinar la unión entre nucleótidos cíclicos y dominios funcionales de unión a nucleótidos cíclicos putativos mediante la técnica de FRET intermolecular.

5.2. Objetivos particulares

1) Construir plásmidos que codifiquen proteínas quiméricas, EPAC-mECFP y EPAC-tdTomate, conformados por el CNBD de EPAC1 unido a dos distintas proteínas fluorescentes (mECFP y tdTomate, respectivamente) en un vector de expresión pRSETb.

2) Expresar las proteínas quiméricas EPAC-mECFP y EPAC-tdTomate en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3) y purificarlas mediante columnas de Ni²⁺.

3) Realizar el ensayo de unión mediante FRET intermolecular con las dos construcciones utilizando 8-fluo-AMPc como análogo fluorescente de AMPc .

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

Medios

- Caldo lisogénico (LB) líquido: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl disueltos en 1 L de agua destilada, posteriormente se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó por autoclave.
- Medio LB sólido: 15 g de agar disueltos en 1 L de medio LB líquido.

Soluciones

- Amortiguador TAE: EDTA 2 mM, Tris-Acetato 40 mM, pH 8.5.
- Solución de CaCl₂ para la preparación de células competentes: CaCl₂ 75 mM y glicerol al 15 %, esterilizado por autoclave.
- Solución de resuspensión de células: Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4.
- Solución para equilibrar la columna de níquel: Tris HCl 10 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 7.4.
- Solución de lavado para purificación de proteínas: Tris HCl 10 mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, pH 7.4.
- Solución de elución: Tris HCl 10 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 7.4.
- Amortiguador de carga de proteínas 5 x: SDS 10 %, glicerol 50 %, EDTA 8 mM, Tris HCl 0.5 M, β-mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 1 µg/mL, pH 6.8.
- Amortiguador para gel separador de poliacrilamida pH 8.8: Tris HCl 1.5 M, Na₂EDTA 8 mM, SDS 0.4 %.
- Amortiguador para gel condensador de poliacrilamida pH 6.8: Tris HCl 0.5 M, Na₂EDTA 5 mM, SDS 0.4 %.
- Gel condensador al 4.5 % de acrilamida: 1 mL del amortiguador para gel condensador de poliacrilamida pH 6.8, 0.6 mL de la solución acrilamida-bisacrilamida, 2.5 µL de tetrametiletilendiamina (TEMED), 37.5 µL de APS, aforado con agua hasta 4 mL.

- Gel separador al 10 % de acrilamida total: 2.5 mL de buffer pH 8.8 para gel separador de poliacrilamida, 3.3 mL de solución de acrilamida-bisacrilamida, 6 μ L de TEMED, 120 μ l de APS.
- Solución de acrilamida: Acrilamida al 30 %, Bis-acrilamida al 0.8 %.
- Solución para teñir geles: azul de Coomassie al 0.5 %, metanol al 50 %, ácido acético al 5 %.
- Solución para desteñir geles: metanol al 20 %, ácido acético al 7.5 %.
- Solución de registro (utilizada en los ensayos de unión y adquisición de los espectros de fluorescencia): Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7.4.

Enzimas

- Enzimas de digestión: *Bam*HI y *Hind*III (Fermentas).
- Enzima ligasa del fago T4 (Fermentas).
- DNA polimerasa Vent (New England Biolabs)

Compuestos

- Agua Mili-Q
- Bromuro de etidio 10 mg/mL (Sigma-Aldrich)
- 8- (2- [Fluoresceinil]-aminoetiltio) adenosín- 3', 5'- monofosfato cíclico (8-fluo-AMPC, de BioLog).
- Marcador O'Gene Ruler TM1kb "DNA Ladder ready to use" (Fermentas).
- Marcador O'Gene Ruler TM "DNA ladder Mix, ready to use" (Fermentas).
- Marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Plásmidos

- EPAC-Venus-pRSETb: Es la construcción que codifica para 6His-CNBD de EPAC I–145cp Venus, dentro del vector pRSETb (Invitrogen).
- mECFP-pRSET (proporcionada por el Dr. Takeharu Nagai, Universidad de Hokkaido, Japón).

- pmAmetrine-DEVD-tdTomate (proporcionada por el Dr. Robert Campbell, Universidad de Alberta, Canadá, a través de Addgene).

Equipo

- Transiluminador DarkReader® DR-45M.
- Espectrofluorómetro (Aminco SLM 8000 modificado por Olis): Se utilizó para medir la fluorescencia durante los ensayos de unión.
- Nanodrop 2000 (Thermo Scientific): Se empleó para medir la absorbancia de las proteínas fluorescentes, cuantificar la cantidad de DNA y de proteína.

Material biológico

- Cepas de *E. coli*:
 - DH5 α para clonación y amplificación de plásmidos.
 - JM109 (DE3) para clonación, amplificación de plásmidos y expresión de proteínas.
 - BL21 (DE3) para expresión de proteínas.

6.2. Métodos

Preparación de células quimiocompetentes

La preparación de las células quimiocompetentes con CaCl₂ se llevó a cabo de acuerdo con el reporte de Li y colaboradores (Li *et al.*, 2010). Este método consiste en picar una sola colonia de *E. coli* para inocularla en 5 mL de medio LB líquido; este preinóculo se dejó crecer a 37 °C toda la noche, con una agitación moderada (220 – 250 rpm).

Al siguiente día, se inocularon 2 mL del preinóculo en 200 mL de LB líquido y se incubó en agitación moderada a 37 °C hasta que la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) alcanzó un valor entre 0.4 y 0.45. Cuando el cultivo alcanzó dicha densidad óptica, se dividió en 4 alícuotas en tubos Falcon (BD) de 50 mL estériles y se dejaron reposar durante 5 min en hielo.

Se centrifugaron a 1,000 g durante 5 min a una temperatura constante de 4 °C. Al terminar la centrifugación se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las 4 pastillas en 20

mL de la solución de CaCl₂ descrita en la sección de materiales. Se dejaron reposar los tubos en hielo durante 5 min y se repitió el lavado 2 veces.

Finalmente, se resuspendió la pastilla con 4 mL de la solución de CaCl₂ para células competentes y se prepararon 40 alícuotas de 100 µL en microtubos de polipropileno (Axygen) de 600 µL. Las alícuotas se guardaron a -70 °C. Estas alícuotas pueden permanecer almacenadas hasta por 3 meses sin perder su eficiencia.

Transformación de células quimiocompetentes

Para amplificar los plásmidos y ligaciones se tomó una alícuota de células competentes, se agregaron 100 ng del plásmido de interés (o 15 µL de la reacción de ligación) y se colocó en hielo durante 20 min. Posteriormente, se dio un choque térmico de 42 °C durante 2 min y se volvió a colocar en hielo durante 5 min. Se le añadieron 400 µL de medio LB sin antibiótico y se dejó en agitación moderada a una temperatura constante de 37 °C durante una hora. Para terminar, se sembraron 100 µL en placas de LB sólido con ampicilina (50 µg/mL) y se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Aislamiento del plásmido

Se inoculó una colonia de bacterias con el plásmido de interés en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina; se dejó toda la noche a temperatura y agitación constante (37 °C, 250 rpm). A la mañana siguiente, se centrifugó el inóculo en una microcentrífuga Eppendorf 5424 durante 5 min a 4,000 g. Se descartó el sobrenadante y se realizó el protocolo rápido del kit “GeneJET Plasmid Miniprep” (Thermo Scientific) como se dicta a continuación. Se resuspendió la pastilla en 250 µL de la solución de resuspensión. Se añadieron 250 µL de la solución de lisis y se mezcló invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces hasta que la solución se volvió viscosa e incolora.

Posteriormente, se añadieron 350 µL de la solución de neutralización y se mezcló por inversión. La muestra se centrifugó a 12,000 g durante 5 min y se transfirió el sobrenadante a una columna del kit. Se centrifugó un minuto a 12,000 g y se descartó la solución que pasó a través de la columna y quedó en el tubo recolector. Se hicieron dos lavados con 500 µL de solución de lavado y se centrifugó a 12,000 g. Se centrifugó una vez más para desechar los residuos de la solución de lavado. Para resuspender el plásmido, en la columna se colocaron 50 µL de agua mili-Q a 50 °C y se dejó incubar durante 2 min. Para eluir, se colocó la columna en un

microtubo de polipropileno (Axygen) de 1.5 mL y se centrifugó a 12,000 g durante 2 min. La muestra se almacenó a -20 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar las PCR se siguió el protocolo que se muestra en la figura 6 y se usaron las siguientes concentraciones finales en la mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen	Concentración Final
Amortiguador ThermoPol (10 x)	5 µL	1 x
Desoxinucleótidos (dNTPs, 10 mM)	1 µL	200 µM
Oligonucleótido 5' (3 µM)	5 µL	300 nM
Oligonucleótido 3' (3 µM)	5 µL	300 nM
Templado de DNA	1 µL (30 ng)	0.6 ng/µL
DNA polimerasa Vent	0.8 µL (1.6 U)	0.03 U/µL
MgSO ₄ (100 mM)	1.5 µL	3 mM
H ₂ O libre de nucleasas	Llevar la reacción a un volumen final de 50 µL	

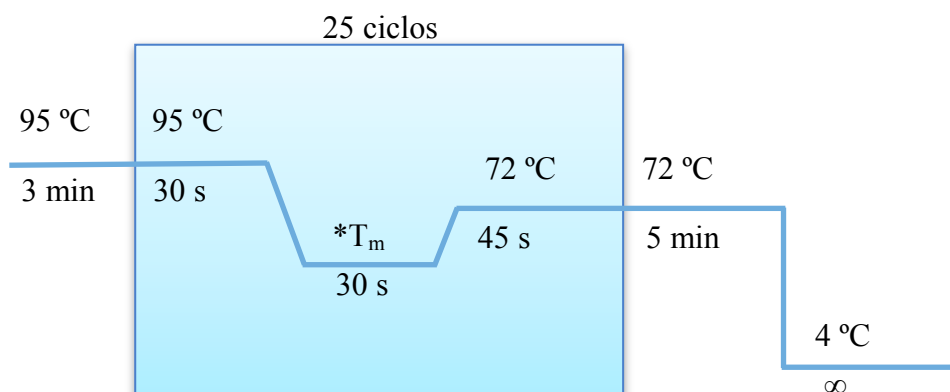


Figura 6. Protocolo usado para las reacciones de PCR. *T_m: Para mECFP se utilizaron 55 °C, mientras que para tdTomato se utilizaron 55 °C, 58 °C y 62 °C.

Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1 % mezclando 0.3 g de agarosa en 30 mL de amortiguador TAE y se calentó durante 45 s en el microondas. Se agregó 1 µL de bromuro de etidio, se vertió en el molde y se dejó gelificar. Ya gelificado, se le colocó dentro de la cámara, la cual se llenó con amortiguador TAE. En los pozos se cargaron de 6 a 10 µL de la muestra y se dejó correr el gel a un voltaje constante de 80 volts. Como el gel estaba preteñido con bromuro de etidio se pudo seguir la separación de las bandas al excitarlo con luz UV o azul.

Aislamiento del DNA a partir de un gel de agarosa

Se cortó la banda de interés del gel de agarosa y se colocó en un microtubo de polipropileno (Axygen) de 1.5 mL. Se añadieron 3 volúmenes del amortiguador QG (solución tomada del kit de Qiagen QIAquick) por volumen de gel y se dejó incubar a 55 °C durante 10 min. Para mantener el pH ácido de la muestra se añadieron 10 µL de acetato de sodio 3 M. Posteriormente, se añadió un volumen de isopropanol y se colocó la muestra en una columna del kit GeneJET, se centrifugó a 12,000 g durante un minuto. Se descartó la solución del tubo colector, se agregaron 750 µL de solución de lavado del kit GeneJET a la columna y la muestra se centrifugó nuevamente durante un minuto. Se realizó una centrifugación adicional para remover completamente la solución de lavado. Se colocó la columna dentro de un tubo de 1.5 mL y se le agregaron 50 µL de H₂O mili-Q. Se incubó durante dos minutos a 60 °C y finalmente se centrifugó a 12,000 g durante 2 min para obtener el fragmento ya purificado de DNA.

Digestión con enzimas de restricción

Todas las reacciones se llevaron a cabo incubando las muestras a 37 °C durante 3 h. Se realizaron reacciones de doble digestión utilizando las siguientes mezclas de reacción.

Para digestiones *Bam*HI – *Hind*III:

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen
Amortiguador <i>Bam</i> HI	10 x	10 µL
DNA	500-1,000 ng	500-1,000 ng
<i>Bam</i> HI	10 U/ µL	1.5 µL
<i>Hind</i> III	10 U/ µL	3 µL
H ₂ O libre de nucleasas	Se llevó la reacción a un volumen final de 100 µL	

Para digestiones *Bam*HI – *Kpn*I:

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen
Amortiguador <i>Bam</i> HI	10 x	10 µL
DNA	500-1,000 ng	500-1,000 ng
<i>Bam</i> HI	10 U/ µL	1.5 µL
<i>Kpn</i> I	10 U/ µL	3 µL
H ₂ O libre de nucleasas	Se llevó la reacción a un volumen final de 100 µL	

Para las digestiones con *EcoRI* – *HindIII*:

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen
Amortiguador Red	10 x	10 µL
DNA	500-1,000 ng	500-1,000 ng
<i>EcoRI</i>	10 U/ µL	1.5 µL
<i>HindIII</i>	10 U/ µL	1.5 µL
H ₂ O libre de nucleasas	Se llevó la reacción a un volumen final de 100 µL	

Purificación de la reacción de digestión mediante columna.

Se utilizó el kit de Zymo DNA clean & concentrator™ -5 de la siguiente manera: Se agregaron 5 volúmenes del amortiguador de unión por un volumen de reacción, se mezcló vigorosamente en el vórtex y se transfirió la muestra a una columna del kit. Se centrifugó durante 30 s a 13,000 g y se descartó la solución del tubo colector. Se añadieron 200 µL de amortiguador de lavado, se centrifugó durante 30 s y se descartó la solución del tubo colector, el paso de lavado se repitió una vez más. Se agregaron 15 µL de agua directamente a la columna y se transfirió la columna a un microtubo de polipropileno de 1.5 mL. Se centrifugó durante 30 s más para obtener la muestra purificada y concentrada.

Ligación

La reacción de ligación de extremos cohesivos entre el vector y el inserto se realizó a una proporción de 1:5 respectivamente y a 22 °C durante toda la noche (12 - 14 h). Se utilizaron las siguientes cantidades de los reactivos para una reacción.

Reactivo	Concentración Inicial	Volumen
Vector	5.9 ng/µL	7 µL
Fragmento	10.9 ng/µL	5 µL
Amortiguador Ligasa de T4	10 x	3 µL
Ligasa	1 U/µL	1 µL
H ₂ O libre de nucleasas	Se llevó la reacción a un volumen final de 30 µL	

Como control se realizó la misma reacción pero sin colocar el fragmento. De esta manera se estimó la proporción de las colonias que sólo poseían el vector parental religado para evitar

falsos positivos. Posteriormente, se transformaron células de *E. coli* competentes de la cepa DH5 α o JM109 (DE3) con 15 μ L de la reacción.

Selección de colonias positivas mediante fluorescencia

Las reacciones de ligación transformadas en la cepa JM109 (DE3) expresaron las construcciones sin el inductor IPTG, por lo que se pudo distinguir mediante la observación de la fluorescencia de qué proteína fluorescente se trataba. Para esto, se colocó la caja Petri sobre el transiluminador Dark Reader que emite luz a longitudes de onda de 400 nm a 500 nm; si la colonia emitía una fluorescencia verde se trataba de mEGFP, si era de color rojo se trataba de la proteína tdTomate.

Expresión de proteína

Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) con las construcciones según el protocolo descrito anteriormente. Se inoculó una sola colonia en 100 mL de LB líquido con ampicilina y se dejó crecer el cultivo en agitación moderada durante \sim 48 h a 20 °C.

Purificación de las proteínas

El cultivo se trasladó a dos tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 2,500 g durante 20 min a una temperatura constante de 4 °C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se recuperó en 2 mL de solución de resuspensión. Los pasos de centrifugación y lavado se repitieron tres veces, al final se agregaron 40 μ L del coctel de inhibidor de proteasas cOmplete (Roche), y la muestra se dividió a la mitad en dos tubos de polipropileno (Axygen) de 1.5 mL. Se rompieron las células con 3 pulsos de sonicación de 50 s, con un minuto de descanso entre ellos. Se centrifugó la muestra a 19,000 g durante 15 min, a una temperatura constante de 4 °C. Se recuperó el sobrenadante (proteína soluble) en microtubos polipropileno (Axygen) de 1.5 mL y se guardó a 4 °C.

Se armó la columna de purificación con 1 mL de Ni-NTA Superflow (Qiagen), y una vez que el níquel se empaquetó completamente, se lavó la columna con 5 mL de la solución para equilibrar (descrita en la sección de materiales). Se añadió la proteína soluble, se lavó la proteína inespecífica con 4 mL de solución de lavado y se eluyó con 3 mL de la solución de elución de tal forma que se produjeron fracciones aproximadamente 200 μ L.

Cuantificación de proteína a través de la ley de Beer-Lambert.

Como el coeficiente de extinción molar (ϵ) de mEGFP es $32,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Cubitt *et al.*, 1999) se calculó la concentración de la proteína midiendo su absorbancia (A) a su pico máximo (435 nm), por medio de la ley de Beer-Lambert.

$$A = \epsilon bc$$

Donde b es el largo de la celda que contiene la muestra (1 cm) y c es la concentración de la muestra en unidades de mol/L. En el caso de las proteínas Tomate y tdTomate la absorbancia se midió a 533 nm y sus ϵ son $69,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $138,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente (Shaner *et al.*, 2004).

Cuantificación de proteína mediante el método de Lowry

La cuantificación se realizó empleando el kit RC DC protein Assay (BioRad). En tubos de 1.5 mL se pipetearon 25 μL de muestra. Se agregaron 125 μL de reactivo I y se mezcló con el vórtex, se dejó incubando un minuto a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se agregaron 125 μL de reactivo II, se mezcló vigorosamente con el vórtex y se centrifugó la muestra a 15,000 g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante por inversión.

A la pastilla formada se le agregaron 127 μL de reactivo A', se incubó durante un periodo de 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se mezcló utilizando un vórtex y se añadió 1 mL de reactivo B. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm.

Electroforesis de gel de poliacrilamida

Se preparó un gel de poliacrilamida al 10% de 1 mm de grosor con el peine y vidrios del sistema de electroforesis mini-protean de BioRad. A 3 μg de cada proteína se le añadió el buffer de cargado y se dejó hervir 10 minutos. La muestra se cargó en el gel y se corrió durante una hora con un voltaje 100 V. Los geles se tiñeron dejándolos 30 min en la solución para teñir, posteriormente se cambió el gel a una solución para desteñir y se dejó incubando 30 min, se cambió varias veces la solución para desteñir hasta que las bandas se apreciaron correctamente.

Adquisición de los espectros de fluorescencia

Los datos de los espectros de fluorescencia se adquirieron en un espectrofluorómetro Aminco SLM 8000, utilizando una lámpara de xenón UXL 450S-O (Ushio, Japón) y una celda

de cuarzo de 3 mL. Para obtener los espectros de excitación de EPAC1-mECFP, 8-fluo-AMPc y EPAC1-Tomate se fijaron las longitudes de onda de emisión en 495 nm, 520 nm y 620 nm, respectivamente. Para los espectros de emisión, se fijaron las longitudes de onda de excitación de la siguiente manera: para EPAC1-mECFP se fija en 430 nm, para 8-fluo-AMPc 470 nm y para EPAC1-Tomate en 513 nm.

Ensayo de unión en espectrofluorómetro

Los ensayos de unión tipo FRET se realizaron en celdillas de cuarzo y de poliestireno para fluorómetro (SIGMA), utilizando distintas estequiometrías de donador:aceptor (1:2, 1:5 y 1:10) en un volumen final de 3 mL. La concentración de donador para ambos pares FRET fue de 50 nM. Adicionalmente se realizaron ensayos para el par EPAC-Tomate/8-fluo-AMPc con una concentración de donador de 10 nM. Para determinar que la unión fuera específica, se realizaron ensayos de competencia con el análogo no fluorescente de AMPc, 8-CPT-AMPc, utilizando una concentración 100 veces mayor a la de su análogo fluorescente. Para cada ensayo se tomaron los espectros de emisión individuales del buffer, donador, acepto, donador en presencia del acepto (condición de FRET) y por último, el espectro del donador, más acepto y competidor. Todos los espectros se adquirieron utilizando la luz de excitación para el donador (para el par con EPAC-mECFP se usó una luz de excitación de 440 nm y para EPAC-Tomate 485nm). A todos los espectros de fluorescencia de los ensayos de unión con proteínas purificadas se les restó el espectro del buffer.

Fotoblanqueo del acepto

Los ensayos se realizaron en el espectrofluorómetro con una celda de cuarzo de 45 μ L con tapa, la cual fue sellada con parafilm para evitar la evaporación de la muestra. Para fotoblanquear al acepto se utilizó un LED verde Luxeon™. Este LED tiene un espectro de emisión que va desde 510 nm a 530 nm, el cual no tendría por qué fotoblanquear al donador. Se adquirió el espectro sin fotoblanquear de EPAC-mECFP utilizando los mismos parámetros que en la sección anterior. Se fotoblanqueó, la muestra de donador en presencia del acepto y se adquirió el espectro de cada uno a distintos tiempos de irradiación. Para asegurarnos que la luz del LED no fotoblanqueaba al donador, se realizó un control irradiando una muestra de EPAC-mECFP a distintos tiempos.

7. RESULTADOS

Se escogió 8-fluo-AMPc como el análogo fluorescente de AMPc para este proyecto. Este análogo fluorescente es una molécula de AMPc conjugada con una molécula de fluoresceína, esta última se encuentra unida al carbono 8 (C8) de la adenina del nucleótido cíclico mediante un espaciador de 6 átomos. Se eligió este análogo fluorescente de AMPc debido a que las modificaciones en el carbono 8 de la base nitrogenada no impiden la interacción entre un CNBD y el derivado de nucleótidos cíclicos (Caretta *et al.*, 1985; Caretta & Saibil, 1989; Mucignat-Caretta & Caretta, 1997). Además la fluoresceína es un fluoróforo brillante, con un alto coeficiente de extinción molar ($\epsilon \sim 79,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y alta eficiencia cuántica (~ 0.9). Otra ventaja es que el 8-fluo-AMPc se encuentra disponible en el mercado y es relativamente más económico (\$13.8 dólares cada 0.1 μmol) comparado con otros análogos (\sim \$ 240 dólares cada 0.1 μmol).

Al usar 8-fluo-AMPc como aceptor en el par FRET, se seleccionó a mECFP (proteína fluorescente de color cian, variedad monomérica) como donador debido que los espectros de emisión reportados para esta proteína se superponen con el espectro de excitación de la fluoresceína. Así mismo, tomando a 8-fluo-AMPc como donador, el mejor aceptor disponible fue tdTomate (proteína roja fluorescente tándem tomate) debido a que su espectro de excitación se superpone con el espectro de emisión de la fluoresceína.

7.1. Diseño y clonación de la construcción de EPAC I–mECFP

Para el diseño de la construcción que codifica a la proteína 6His-CNBD de EPAC I-mECFP (EPAC-mECFP) se utilizó como base un plásmido que codifica para 6His-CNBD de EPAC I-145cpVenus (EPAC-Venus-pRSETb) en el vector pRSETb (figura suplementaria 1). En el plásmido EPAC-Venus, la secuencia que codifica a la proteína fluorescente se encuentra flanqueada por los sitios de restricción *Bam*HI en su extremo 5' y *Hind*III en el 3'. Por este motivo se diseñó un par de oligonucleótidos (tabla 1) para insertar estos sitios de restricción en la secuencia de mECFP. Las reacciones de PCR se realizaron según el protocolo descrito en la sección de métodos. En un gel de agarosa 1% se corroboró la amplificación del fragmento de DNA que codifica a mECFP flanqueado por los sitios *Bam*HI y *Hind*III en sus extremos 5' y 3' respectivamente (figura 7A).

Tabla 1. Oligonucleótidos para la amplificación de proteínas fluorescentes.

Nombre	Secuencia*	Función
Tak 178F	5' CCC GGA TCC GAT GGT GAG CAA GGG CGA GGA G 3'	Inserción del sitio <i>Bam</i> HI en el extremo 5'
Tak 90R	5' GGA AGC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G 3'	Inserción del sitio <i>Hind</i> III en el extremo 3'

*En negrita se muestran los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Hind*III

Se purificó el DNA de la banda en el gel de agarosa correspondiente al tamaño de la secuencia de nucleótidos de la proteína fluorescente y posteriormente se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Paralelamente se realizó la doble digestión de 1 µg del plásmido EPAC-Venus con el mismo par de enzimas (figura 7B) y se aisló el fragmento de ~3,300 pb correspondiente al vector lineal.

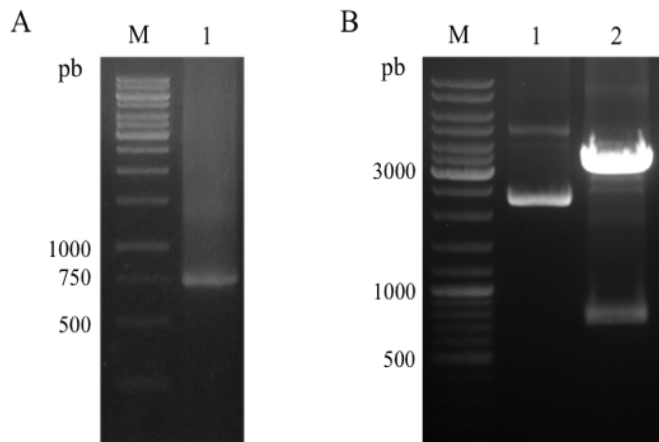


Figura 7. Geles de agarosa del inserto y vector para la construcción del plásmido EPAC-mECFP. En el panel A, se puede apreciar la banda correspondiente al producto de PCR de mECFP usando los oligos Tak 178F y Tak 90R; la banda corresponde al tamaño esperado (~750 pb). En el panel B, se muestra el plásmido pRSET con la construcción 6His-CNBD de EPAC I-145 cpVenus (carril 1) y las bandas correspondientes a su digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (carril 2). El marcador (M) utilizado para el panel A fue O'Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas) y para el panel B el O'Gene Ruler™ DNA ladder Mix (Fermentas).

Teniendo los dos fragmentos purificados se prosiguió con la reacción de ligación utilizando una proporción 1:5 de vector e inserto. Como control se puso una reacción sin inserto en las mismas condiciones. Las reacciones de ligación se realizaron a 22 °C durante toda la noche para después transformar células DH5α con el plásmido ligado. En la placa del control negativo, no se obtuvieron colonias, mientras que en la placa correspondiente a la ligación, crecieron 53 colonias. Se seleccionaron 3 colonias al azar de esta última caja, y después de purificar el DNA plasmídico, se confirmó la construcción por secuenciación.

7.2. Diseño y clonación de EPAC-tdTomate

Usando a 8-fluo-AMPC como donador del par FRET, seleccionamos como aceptor a tdTomate (está compuesto por dos proteínas rojo fluorescente en tándem) debido a que sus propiedades espectroscópicas son adecuadas para fungir como aceptor y es una de las proteínas fluorescentes más brillantes dentro de las proteínas fluorescentes de color rojo (Shaner *et al.*, 2004).

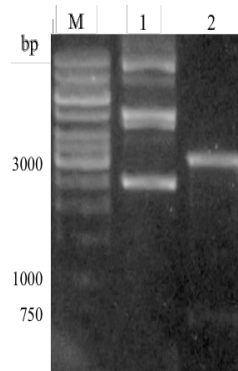


Figura 8. Gel de agarosa de la digestión del plásmido EPAC-mECFP con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. En el carril 1 está el plásmido no digerido de EPAC-mECFP, mientras que en el carril 2 podemos ver dos bandas, que corresponden a pRSETb-CNBD de EPAC I (~3,300 pb) y a mECFP (750 pb).

Para el diseño de la construcción 6His-CNBD de EPAC I- tdTomate (EPAC-tdTomate, figura suplementaria 2) se utilizó como vector base a EPAC-mECFP, el cual se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (figura 8). Se aisló el fragmento de ~3,300 pb correspondiente a la secuencia del vector con el CNBD de EPAC I.

La secuencia que codifica a tdTomate la obtuvimos del plásmido pmAmetrine-DEVD-tdTomate. Este plásmido codifica para dos proteínas fluorescentes distintas, mAmetrine y tdTomate. Debido a que estas proteínas fluorescentes comparten el mismo amino y carboxilo terminal, están flanqueadas en sus extremos 5' y 3' por la misma secuencia de nucleótidos y por lo tanto comparten los mismos oligonucleótidos para su amplificación. Por lo anterior, es complicado amplificar únicamente a tdTomate si se utiliza el plásmido completo como templado para la PCR. En vista de esto decidimos utilizar sólo el fragmento de DNA que codifica a tdTomate como templado, como se explica a continuación.

En el plásmido, la secuencia de tdTomate se encuentra entre los sitios de restricción *Kpn*I y *Bam*HI, por lo que realizamos una doble digestión y aislamos ese fragmento (figura 9). Se utilizó el fragmento purificado como templado de la reacción de PCR para insertar los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III.

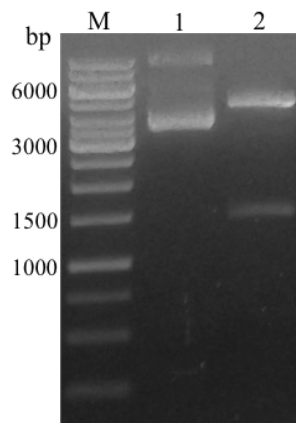


Figura 9. Reestricción con *Kpn*I-*Bam*HI del plásmido pmAmetrine-DEVD-tdTomate. En el carril 1 se observa el plásmido no digerido, mientras que en el carril 2 se observa la digestión con ambas enzimas, el fragmento de menor tamaño (~1,500 pb) corresponde a la secuencia de DEVD-tdTomate

Como tdTomate posee el mismo amino y carboxilo terminal que mEGFP se utilizaron los mismos oligonucleótidos para las PCR. Se realizaron tres reacciones de PCR siguiendo el protocolo que se describió en la sección de métodos. En cada reacción se utilizó una temperatura de fusión (T_m) diferente (55°C, 58°C y 62°C). A pesar de haber utilizado distintas T_m , en todos los casos, se obtuvieron bandas inespecíficas (figura 10), por lo que la banda correspondiente a tdTomate (~1,500 pb) se cortó y purificó para su posterior digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III.

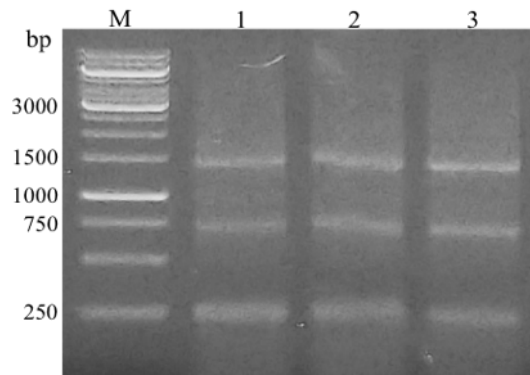


Figura 10. Amplificación por PCR del fragmento correspondiente a tdTomate utilizando distintas T_m . En cada carril se muestran los productos obtenidos de las PCR utilizando una T_m (55 °C, 58 °C y 62 °C, carriles 1, 2 y 3 respectivamente) distinta. En todas las reacciones se observa el producto esperado (~1,500 pb) y otras dos bandas inespecíficas.

Teniendo el vector y el fragmento digeridos y purificados se prosiguió con la reacción de ligación como dicta el protocolo de la sección de métodos. En esta ocasión se transformó en la cepa JM109 (DE3), con el fin de seleccionar las colonias positivas mediante su color y fluorescencia (figura 11A).

Se seleccionaron 5 colonias rojas al azar y se inocularon en 3 mL de LB líquido con ampicilina para purificar el plásmido. Para asegurarnos de que el plásmido correspondiera a la construcción EPAC-tdTomate realizamos una doble digestión con las enzimas *Eco*RI y *Hind*III que se encuentran flanqueando la construcción.

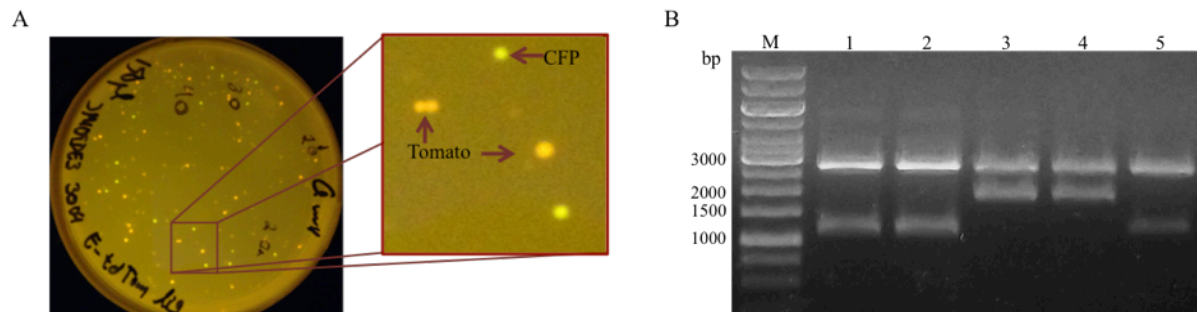


Figura 11. Selección de colonias positivas. En el panel A se muestra una fotografía de la caja Petri que contiene las colonias transformadas con la reacción de ligación después de dejarla incubando toda la noche a 37 °C. Las colonias rojas son las que contienen a tdTomate o a Tomato y las verdes expresan a mEGFP. El panel B muestra el gel de agarosa con las digestiones de 5 colonias rojas seleccionadas al azar. Se pueden apreciar dos patrones de digestión, el de los carriles 1, 2 y 5 corresponde al plásmido que codifica a EPAC-Tomate, mientras que el de los carriles 3 y 4 corresponde a EPAC-tdTomate.

Al correr las muestras digeridas en un gel de agarosa al 1%, nos encontramos con algo sorprendente, existían dos poblaciones de plásmidos (figura 11B). Por los tamaños de las bandas dedujimos que unas colonias poseían la construcción esperada: EPAC-tdTomate (EPAC unido a dos proteínas fluorescentes en tándem, ~1,900 pb. Figura 11B, carriles 3 y 4), mientras que otras colonias portaban la construcción EPAC-Tomate (EPAC unido a una sola proteína fluorescente, ~1,200 pb. Figura 11B, carriles 1, 2 y 5), esto posteriormente se confirmó por secuenciación.

7.3. Expresión, purificación y cuantificación de las quimeras

Aunque el objetivo era sólo purificar y expresar las construcciones EPAC-mEGFP y EPAC-tdTomate, se decidió expresar también a EPAC-Tomate debido a que las colonias eran fluorescentes, lo cual era un indicio de que la construcción se estaba expresando y podía ser viable para los experimentos de ensayo de unión. Se transformaron células de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) con 100 ng de plásmido de cada construcción.

Se picó una sola colonia de cada construcción y se inoculó en 100 mL de LB líquido con ampicilina. El cultivo se incubó durante 2 días a 20 °C. Como las tres proteínas quiméricas poseen seis histidinas en su extremo amino la purificación se llevó a cabo en una columna de níquel. Se cuantificó la concentración de las proteínas utilizando dos métodos, el método de Lowry y midiendo la absorbancia de la proteína fluorescente para después calcular la concentración mediante la ley de Lambert-Beer. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 2, comparando las concentraciones obtenidas, la diferencia entre métodos es menor del 2 %. Por lo que es válido usar la ley de Lambert-Beer como método de cuantificación para proteínas fluorescentes.

Tabla 2. Concentraciones de las proteínas quiméricas.

	Concentración de proteína (µM)	
	Ley Lambert-Beer	Método de Lowry
EPAC-mEGFP	43.7	43.5
EPAC-Tomate	97.7	96.8
EPAC-tdTomate	2.0	N. D.*

*No determinado

Para corroborar la pureza e integridad de las proteínas quiméricas se corrieron las muestras en un gel desnaturalizante de acrilamida (SDS-PAGE). Los procesos de expresión y purificación de EPAC-mECFP y EPAC-Tomate fueron exitosos, ya que se ve una única banda en los geles de acrilamida que corresponde al tamaño esperado de 47 kDa (figura 12A), pero para EPAC-tdTomate no fue igual. En el gel de acrilamida correspondiente a EPAC-tdTomate se aprecian varias bandas (figura 12B), tres de las cuales corresponden al peso del CNBD de EPAC I solo (20 kDa), EPAC-Tomate (47 kDa) y EPAC-tdTomate (74 kDa). Debido a que EPAC-tdTomate se degradó, decidimos continuar el proyecto sólo con EPAC-mECFP y EPAC-Tomate.

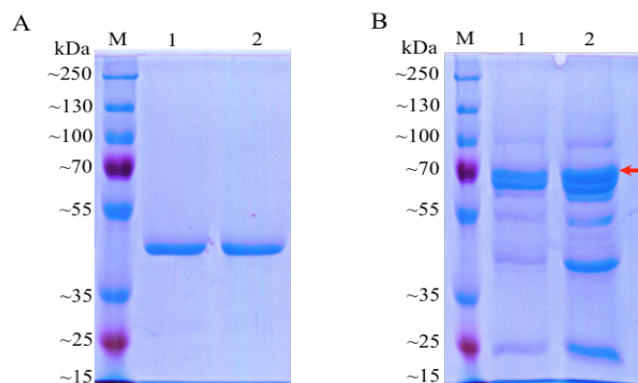


Figura 12. Geles de policacrilamida de las proteínas purificadas. En el panel A se observa el gel correspondiente a EPAC-mECFP (1) y EPAC-Tomate (2), las cuales tienen un peso aproximado de 47 kDa. Las muestras correspondientes a tdTomate se muestran en el panel B, la banda señalada mediante una flecha corresponde al peso esperado de la proteína (~74 kDa), las otras bandas son resultado de la degradación.

7.4. Espectros de fluorescencia de los fluoróforos

Con el objetivo de dilucidar si la adición del CNBD al N-terminal de las proteínas fluorescentes afectaba sus características espectroscópicas se determinaron los espectros de excitación y de emisión de los fluoróforos usados en este trabajo (figura 13).

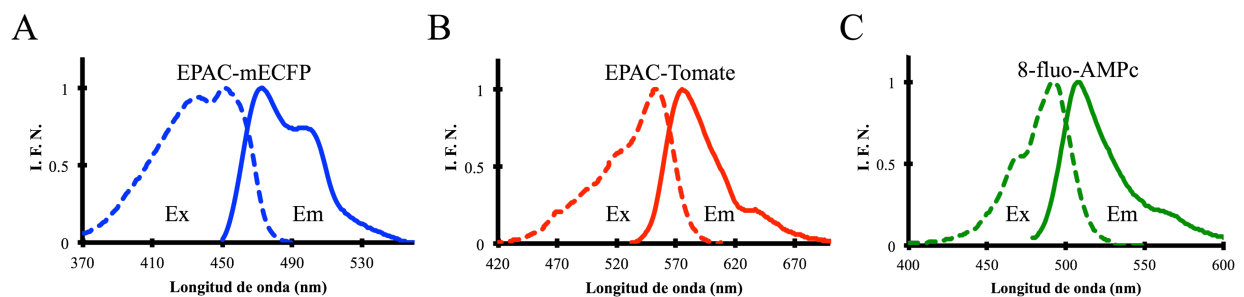


Figura 13. Espectros de fluorescencia de las proteínas quiméricas y el análogo fluorescente de AMPc. Se muestran en líneas punteadas los espectros de excitación y en líneas sólidas los espectros de emisión de EPAC-mECFP (A), EPAC-Tomate (B) y 8-fluo-AMPC (C). En el panel A se observa la forma característica de los espectros de fluorescencia que tienen todas las variantes de mECFP, los picos de excitación de EPAC-mECFP están en 437 nm y 451 nm, mientras que los de emisión en 472 nm y 496 nm. Para EPAC-Tomate (panel B), los picos de excitación y de emisión están en 553 nm y 576 nm respectivamente. En el caso de 8-fluo-AMPC los picos máximos de excitación y de emisión son 492 nm y 508 nm, respectivamente. Para obtener los espectros de excitación de EPAC-mECFP, EPAC-Tomate y 8-fluo-AMPC se fijó la longitud de onda de emisión en 495 nm, 620 nm y 520 nm, respectivamente. Para los espectros de emisión se fijaron las longitudes de onda de excitación a 430 nm, 513 nm y 460 nm. I. F. N., intensidad de fluorescencia normalizada.

Además, confirmamos que, tal como se esperaba el espectro de emisión de EPAC-mECFP, se sobrepone con el espectro de excitación de 8-fluo-AMPC (figura 14A), mientras que el espectro de excitación de EPAC-Tomate, se sobrepone con el de emisión de 8-fluo-AMPC (figura 14B). Por lo tanto, nuestras construcciones tienen las características necesarias para formar un buen par FRET con 8-fluo-AMPC.

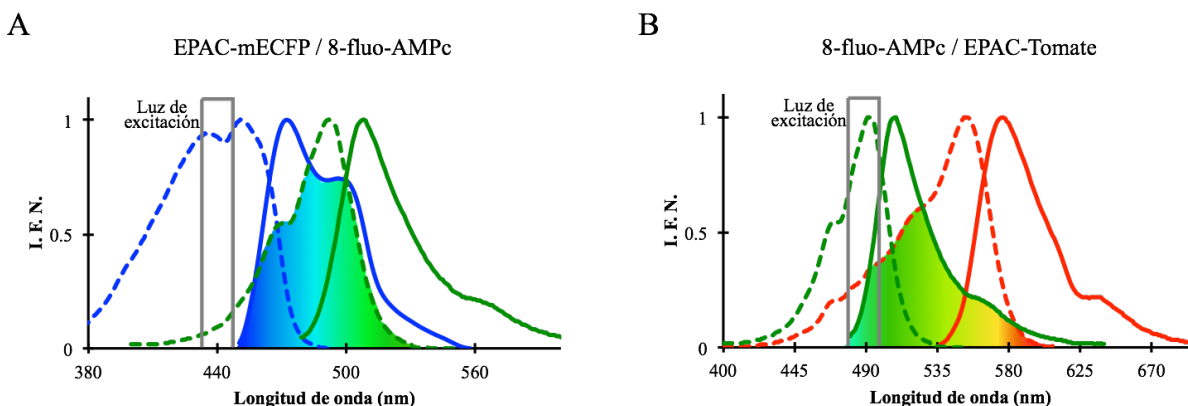


Figura 14. Sobreposición de los espectros de fluorescencia de los pares FRET. Los espectros de excitación se encuentran en línea punteada, mientras que las líneas sólidas pertenecen a los espectros de emisión, el área correspondiente a la sobreposición del espectro de emisión del donador con el espectro de excitación del aceptor se encuentra coloreada. El panel A corresponde al par EPAC-mECFP (línea azul)/8-fluo-AMPC (línea verde) y el panel B a 8-fluo-AMPC (línea verde)/EPAC-Tomate (línea roja). En ambos paneles se muestra la luz de excitación (caja gris) que se seleccionó para hacer los ensayos de unión. I. F. N., intensidad de fluorescencia normalizada.

7.5. Ensayo de unión

Partiendo de lo anterior, se realizaron los ensayos de unión como se menciona en la sección de métodos. Para EPAC-mECFP se utilizó una longitud de onda de excitación de 440 nm, con 50 nM de donador y 100 nM de aceptor. Como controles se obtuvieron por separado los espectros de emisión de cada uno de los fluoróforos (figura 15A, trazos de color gris claro para el donador EPAC-mECFP y gris oscuro para el aceptor 8-fluo-AMPC).

Comparando los trazos del donador (EPAC-mECFP) en ausencia del aceptor (figura 15A, trazo gris claro) y la condición de donador en presencia del aceptor (EPACm-ECFP con 8-fluo-AMPC, trazo azul discontinuo), se ve una clara disminución en la fluorescencia del donador. Esta reducción es de casi el 80% (figura 15A, comparar trazos gris claro con azul discontinuo en el pico del donador, ~470 nm). Conjuntamente, ocurre un aumento abrupto en la fluorescencia del aceptor (el pico está en 508 nm).

La disminución de la fluorescencia del donador y el aumento en la fluorescencia del aceptor se explican mediante la transferencia de energía por resonancia (FRET) entre el donador y el aceptor. Que en este caso sucede debido a la unión entre el análogo fluorescente de AMPc y el CNBD de EPAC I presente en nuestra proteína quimérica EPAC-mECFP. Esta unión logra acercar suficientemente a los dos fluoróforos para que ocurra FRET, tal como lo esperábamos.

Para comprobar la especificidad de la unión del análogo fluorescente de AMPc con el CNBD se realizó un ensayo de competencia. Se eligió como competidor al análogo no fluorescente de AMPc, 8-CPT-AMPc, y se utilizó a una concentración 100 veces mayor que la del aceptor (figura 15A, trazo sólido azul). Como se puede observar (figura 15A, comparar trazo sólido azul con trazo discontinuo azul), en presencia de competidor (trazo sólido azul) la fluorescencia del pico del donador (~470 nm) incrementa y la del aceptor (~508 nm) disminuye. Lo que indica que el análogo fluorescente de AMPc (8-fluo-AMPc) fue desplazado del CNBD por el análogo no fluorescente. Lo que trajo como consecuencia, un aumento en la distancia entre el donador y aceptor, evitando así la transferencia de energía. De esta manera se comprobó que el AMPc fluorescente interacciona específicamente con el CNBD de EPAC I y que nuestro ensayo de unión es confiable.

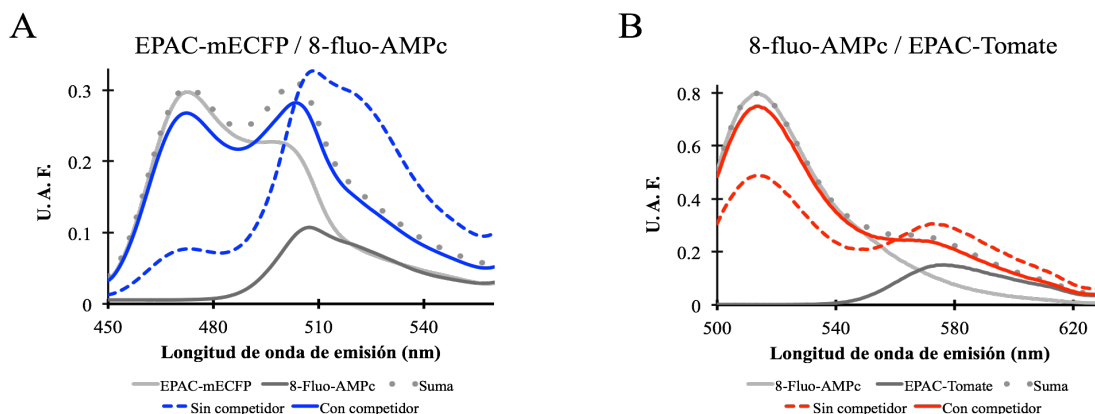


Figura 15. Ensayo de unión entre EPAC-mECFP y 8-fluo-AMPc y EPAC-Tomate y 8-fluo-AMPc. Se muestran los trazos promedio (n=3) de los ensayos de unión que se realizaron con una luz de excitación de 440 nm para el panel A y 485nm para el panel B con una estequiometría 1:2 de donador:aceptor (línea discontinua y con color), utilizando 50 nM de donador (EPAC-mECFP para el panel A y 8-fluo-AMPc para el panel B) y 100 nM de aceptor (8-fluo-AMPc para el panel A y EPAC-Tomate para el panel B). Para determinar si la unión era específica se compitió con 10 mM de 8-CPT-AMPc (línea sólida y con color); adicionalmente se tomaron los espectros de cada uno de los fluoróforos por separado (gris oscuro para el aceptor y gris claro para el donador). El espectro en línea gris punteada (suma) corresponde a la suma de los espectros del donador y el aceptor, el cual es prácticamente igual al del ensayo con competidor ya que éste último está formado por el donador en ausencia de FRET más la emisión del aceptor producida por la excitación basal con la luz de excitación usada en los ensayos.

Cabe mencionar que en la condición con competidor (sin FRET) el espectro de emisión (figura 15A, trazo sólido azul) no adquiere la forma esperada, es decir, la forma del espectro del donador EPAC-mECFP en ausencia del aceptor (figura 15A, trazo gris claro). Esto se debe a que el espectro en la condición con competidor (figura 15A, trazo sólido azul) está formado por la suma de dos componentes (figura 15A, trazo gris discontinuo), la emisión del donador cuando no hay FRET y la emisión del aceptor por la excitación directa con la luz de 440 nm.

A pesar de ello, la reducción de fluorescencia en el pico del donador es una prueba contundente de que ocurre FRET. Por lo tanto, el ensayo sí está detectando, como esperábamos, la interacción entre el CNBD y el AMPc marcado.

Uno de los controles más usados en ensayos de FRET descritos en la literatura es el fotoblanqueo del aceptor (Ward *et al.*, 1980; Vogel *et al.*, 2006; Clegg, 2009). El experimento consiste en colocar al donador en presencia del aceptor y registrar su fluorescencia; después se fotodestruye específicamente al aceptor (se utiliza una longitud de onda que el donador no absorba) y se observa el aumento en la fluorescencia del donador a través del tiempo.

Por lo anterior, para confirmar que sí estábamos observando FRET, decidimos hacer ese mismo control en nuestro ensayo de unión (figura 16). Primero obtuvimos el espectro del donador en ausencia del aceptor (figura 16, trazo gris discontinuo). Después adquirimos el espectro del donador en presencia del aceptor (figura 16, $t=0$, trazo color azul marino). A esa misma muestra la irradiamos con la luz de un LED verde y registramos sus espectros de fluorescencia a distintos tiempos hasta llegar a una reducción en la fluorescencia del aceptor de aproximadamente 50 %.

Asimismo, para corroborar que la luz del LED que usamos para fotoblanquear al aceptor no estuviera dañando directamente al donador, hicimos el mismo experimento pero en ausencia del aceptor. Nuestros resultados muestran que el LED verde Luxeon™ no compromete la integridad de mECFP (figura suplementaria 3).

Al fotoblanquear el aceptor en presencia de donador observamos la recuperación de la fluorescencia en el pico del donador y una disminución de fluorescencia en el del aceptor (figura 16). Estos resultados confirman, nuevamente, la validez de nuestro método.

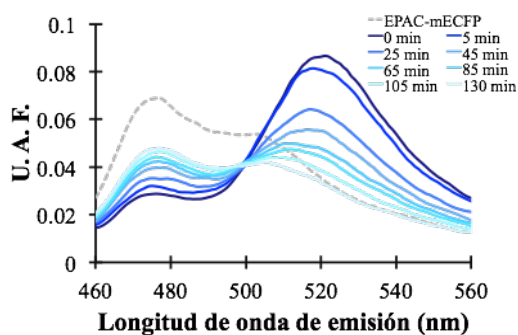


Figura 16. Fotoblanqueo de 8-fluo-AMPC. En la gráfica se muestran los espectros de EPAC-mECFP (línea gris punteada) y el fotoblanqueo del aceptor, a diferentes tiempos, en la condición EPAC-mECFP en presencia de 8-fluo-AMPC. El fotoblanqueo se realizó con un LED verde Luxeon™, el cual excita preferencialmente a 8-fluo-AMPC. U. A. F., unidades arbitrarias de fluorescencia.

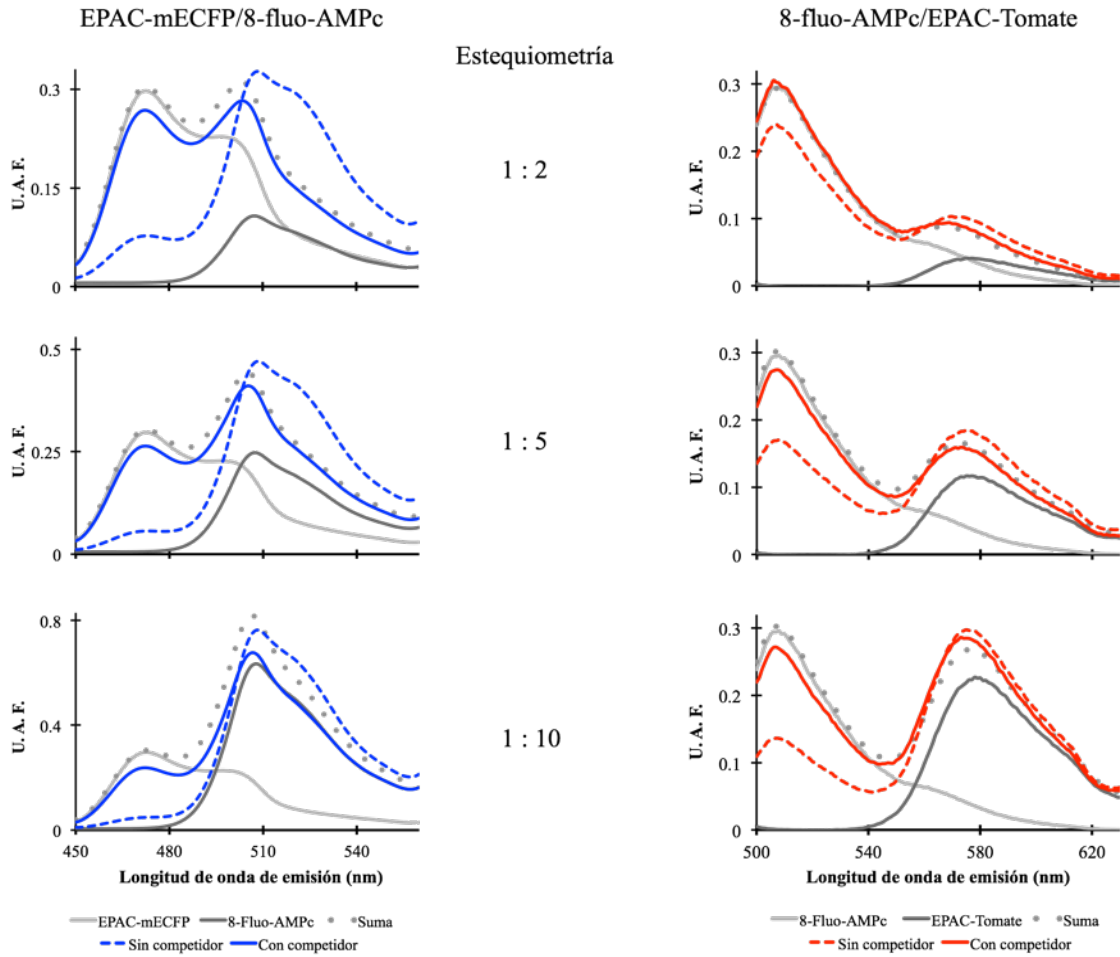
En el caso de los ensayos de unión usando el par FRET compuesto por el donador 8-fluo-AMPC y el aceptor EPAC-Tomate (figura 15B) se utilizó una luz de excitación de 485 nm y una concentración de donador y aceptor de 50 nM y 100 nM, respectivamente, que es la misma que se usó en el ensayo anterior. De igual manera, se registraron los espectros de la condición con competidor y de los fluoróforos individuales (figura 15B).

Con este par FRET encontramos resultados similares a los de EPAC-mECFP/8-fluo-AMPC. La unión de 8-fluo-AMPC a EPAC-Tomate permite la transferencia de energía entre los fluoróforos que se ve reflejada en la disminución de la fluorescencia del donador (en este caso 8-fluo-AMPC) y el aumento de fluorescencia del aceptor (para este par es EPAC-Tomate). Al igual que en el ensayo anterior, se observa una excitación basal del aceptor.

En este ensayo, la disminución del pico del donador (8-fluo-AMPC) en presencia del aceptor fue de ~40%. Comparando estos resultados con el otro par FRET, la disminución fue de tan solo la mitad. Lo que nos indica que el par FRET EPAC-mECFP/8-fluo-AMPC es una mejor opción para realizar futuros ensayos de unión. A pesar de ello, el par 8-fluo-AMPC/EPAC-Tomate presentó una característica deseable, la intensidad de fluorescencia de la proteína fluorescente (Tomate) es mayor a la de mECFP, por lo que es posible realizar el ensayo con una concentración menor de donador y aceptor.

Posteriormente, realizamos los ensayos de unión fijando distintas estequiometrías de donador:aceptor (1:2, 1:5 y 1:10), esto con el fin de comprobar la versatilidad del ensayo. En todos los ensayos observamos FRET (figura 17A). Sin embargo, la forma del espectro en la condición con competidor resultó distinta para cada estequiometría (figura 17B). Esto se debe a que, tal como lo habíamos visto en los ensayos anteriores, la luz de excitación que empleamos para el donador excita basalmente al aceptor (figura 15). Por lo tanto, al incrementar la proporción del aceptor también incrementa su fluorescencia basal (no dependiente de FRET).

A



B

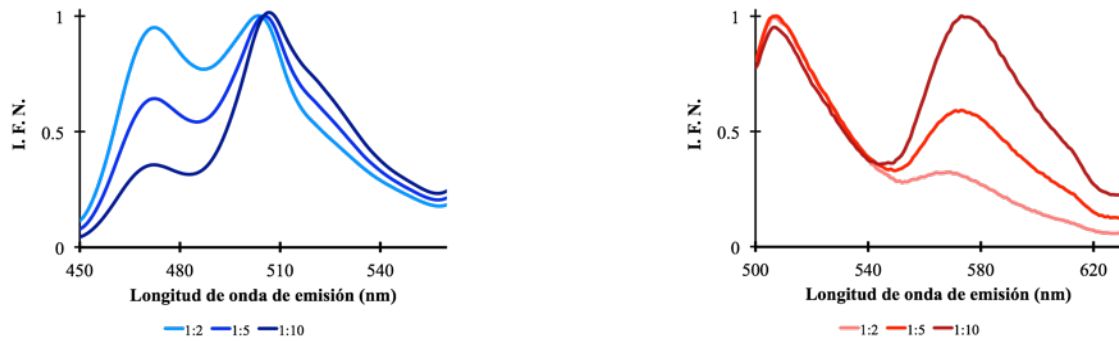


Figura 17. Ensayos de unión a distintas estequiometrías. En el panel A se muestran los ensayos de unión de EPAC-mECFP/8-fluo-AMPc (azul) y EPAC-Tomate/8-fluo-AMPc (rojo) a distintas estequiometrías (las concentraciones absolutas se muestran en la tabla 3); para estos ensayos se usaron las mismas longitudes de onda de excitación que en la figura anterior. En el panel B se muestran los espectros normalizados de los ensayos de unión con el competidor para mostrar claramente el cambio de la forma del espectro dependiente de la estequiometría.

Para calcular la eficiencia de FRET, primero se corrigieron los datos para evitar el problema de la excitación basal de los aceptores. Esto se hizo restando el espectro de emisión del aceptor (adquirido en las mismas condiciones con las que se hizo el ensayo de unión) al espectro de donador más aceptor y posteriormente utilizamos la siguiente fórmula:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

Donde E es la eficiencia de FRET, F_{DA} es la fluorescencia del donador en presencia del aceptor (hay FRET) y F_D es la fluorescencia del donador en ausencia del aceptor (Lakowicz, 2006). De los espectros seleccionamos la fluorescencia del pico máximo de emisión de cada donador, los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Eficiencia de FRET

Par FRET (donador/aceptor)	Proteína purificada	Estequiometría (donador:aceptor)	[Donador] (nM)	Eficiencia de FRET
EPAC-mECFP / 8- fluo-AMPc	Sí	1 : 2	50	0.75
	No	1 : 2	50	0.43
	Sí	1 : 5	50	0.79
	Sí	1 : 10	50	0.84
8-fluo-AMPc / EPAC- Tomate	Sí	1 : 2	50	0.35
	Sí	1 : 2	10	0.21
	Sí	1 : 5	10	0.37
	Sí	1 : 10	10	0.48

Una de las perspectivas de este proyecto es utilizar este ensayo en un tamizaje de alto rendimiento (“high-throughput screening”) para comprobar la función de CNBDs no caracterizados encontrados por homología de secuencia. Por ello, la disminución del tiempo y la eliminación de pasos no necesarios en la preparación del ensayo son características deseables.

Por lo anterior, se realizó adicionalmente un ensayo de unión utilizando la proteína quimérica EPAC-mECFP no purificada (figura 18). Es decir, usando la fracción soluble de proteína obtenida después de sonicar los cultivos y centrifugarlos. Se eligió para este ensayo el par EPAC-mECFP/8-fluo-AMPc debido a que es el par con mayor eficiencia de FRET.

Al comparar las gráficas de las condiciones en presencia y ausencia de competidor (figura 18), se observa que la interacción entre el análogo fluorescente de AMPc y el CNBD de EPAC-mECFP es específica. Comparando la eficiencia de FRET de los ensayos en las mismas condiciones pero con proteínas purificadas, se ve una disminución al hacerlo con la proteína sin purificar (tabla 3). A pesar de ello, es evidente que ocurre FRET, lo cual indica que este método es prometedor para realizar un tamizaje bioquímico para averiguar la función de CNBD en proteínas no caracterizadas.

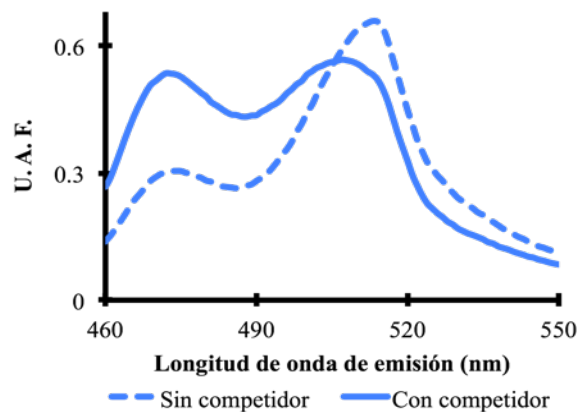


Figura 18. Ensayo de unión entre EPAC-mECFP y 8-fluo-AMPc utilizando proteína no purificada. Como mECFP absorbe luz a 435 nm mediante el cromóforo pudimos calcular únicamente la concentración de nuestra proteína quimérica dentro de la fracción soluble y así realizar el ensayo en las mismas condiciones que los anteriores (luz de excitación de 440 nm, una concentración de 50 nM, 100 nM y 10 mM de donador, aceptor y competidor respectivamente).

8. DISCUSIÓN

Diseño y clonación de las construcciones

La construcción EPAC-mEGFP se clonó con éxito. Para la selección de las colonias positivas, en este caso, no utilizamos la selección por color ya que a simple vista el color y la fluorescencia de 145cp Venus y mEGFP en las colonias de la caja Petri es muy parecida. Para la selección entre proteínas fluorescentes de color muy parecido se podrían inocular las colonias en un volumen pequeño (3-5 ml), incubarlas en agitación toda la noche a 37 °C y obtener su espectro de excitación y de emisión en el espectrofluorómetro al siguiente día para así diferenciar la variante de proteína fluorescente que está en la construcción.

En el caso de EPAC-tdTomate, el método de selección por color simplificó el trabajo en el momento de buscar las colonias que poseyeran el plásmido con nuestra construcción, ya que sólo seleccionamos colonias rojas y fluorescentes. Sin embargo, cuando verificamos los plásmidos aislados de las colonias rojas fluorescentes nos dimos cuenta de que existían dos poblaciones (figura 11B): unas colonias portaban el plásmido esperado (EPAC-tdTomate) y otras poseían una variante con EPAC fusionado a una sola proteína fluorescente (EPAC-Tomate).

Es importante mencionar que no esperábamos obtener a EPAC-Tomate, la cuál está formada por el CNBD de EPAC I unida a una sola copia de la proteína roja fluorescente Tomate. La proteína roja fluorescente tdTomate (tándem Tomate) es una proteína dimérica formada por dos proteínas rojo fluorescente, estas proteínas fluorescentes se encuentran en la misma cadena polipeptídica y se encuentran unidas por un espaciador de 12 aminoácidos. Estas dos proteínas son prácticamente idénticas, sólo los 7 aminoácidos flanqueantes en sus extremos amino y carboxilo son distintos. Esto le confiere una excepcional similitud (>90%) de secuencia de nucleótidos por lo que podría esperarse que la eliminación de una de sus copias se sucediera por recombinación.

Este tipo de eliminación de fragmentos en plásmidos que contienen secuencias repetidas se ha reportado en algunas cepas de *E. coli* (Ribeiro *et al.*, 2008), entre ellas se encuentra la cepa JM109 (DE3), que fue la que utilizamos para clonar esta construcción. Ribeiro y colaboradores reportan que a pesar de que estaban utilizando plásmidos sin resistencia a kanamicina, observaban colonias de *E. coli* transformadas con esos plásmidos creciendo en placas con dicho

antibiótico. Los plásmidos que usaron en el estudio fueron construidos en el vector de expresión para células de mamífero pCIneo, el cual tiene la secuencia del gen de la β -lactamasa. Esta enzima confiere resistencia a ampicilina a las bacterias portadoras del plásmido y sirve como un marcador de selección en célula bacterianas. Además, contiene la secuencia del gen de la neomicina fosfotransferasa bajo el promotor SV40, por lo que sólo funciona como marcador de selección en células de mamífero, y las vuelve resistentes a antibióticos de la familia de los aminoglucósidos como la neomicina y kanamicina.

Después de analizar los plásmidos presentes en las bacterias resistentes a kanamicina mediante patrones de digestión y secuenciación, se dieron cuenta de que habían perdido más de 1,000 pares de bases en cada plásmido. Además, esta región faltante estaba flanqueada por una secuencia idéntica formada por tan sólo 28 pares de bases. Adicionalmente, reportaron que la frecuencia de recombinación en la cepa JM109(DE3) fue entre diez y treinta veces mayor que en la cepa DH5 α .

En nuestro proyecto, este evento de recombinación fortuito resultó ser benéfico, porque terminamos usando a EPAC-Tomate como aceptor en el par FRET, ya que resultó en la expresión de una proteína estable, a diferencia de EPAC-tdTomate, la cual fue susceptible a degradación durante la purificación.

Expresión, purificación y cuantificación de proteína

La expresión se realizó en *E. coli* con la cepa BL21 (DE3). Esta cepa contiene el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (RNAP-T7) en su cromosoma bacteriano. Se usó esta cepa ya que la transcripción del gen de la RNAP-T7 se encuentra regulada mediante el represor *lac*, el cual evita que se transcriba cuando no hay inductor. A pesar de ello, existe una expresión basal de la RNAP-T7 (Studier & Moffatt, 1986), por lo que incluso en ausencia del inductor se producen unos cuantos transcritos, que se traducen en la enzima RNAP-T7 y esta a su vez puede transcribir las secuencias que se encuentren bajo el promotor del fago T7.

El vector que utilizamos para hacer la construcción fue pRSETb, el cual es un vector de tamaño pequeño y alto número de copias. En comparación con las 15 a 20 copias del plásmido que se producen con pET, el vector de expresión comúnmente utilizado, se llegan a producir entre 500 y 700 copias del plásmido pRSETb dentro de la bacteria.

La ventaja de usar un plásmido basado en el vector pRSETb combinado con una cepa de *E. coli* con genotipo DE3, radica en que se obtiene un buen nivel de expresión de la proteína recombinante sin agregar el inductor IPTG. Esto sucede ya que la construcción se encuentra bajo el promotor T7 y aprovechando la expresión basal de la RNAP-T7 y el alto número de copias que se producen del plásmido, obtuvimos una cantidad suficiente de proteína.

El seguimiento del proceso de expresión se simplificó gracias a que las construcciones poseían proteínas fluorescentes y al excitar los cultivos se observa la fluorescencia de las proteínas. De hecho, la presencia de fluorescencia es un indicativo de que la proteína fluorescente se encuentra bien plegada ya que el cromóforo sólo es fluorescente cuando se encuentra dentro del barril β intacto.

En estudios donde la proteína fluorescente se desnaturaliza o el cromóforo se aisló enzimáticamente, la fluorescencia desaparece (Niwa *et al.*, 1996) y si los cromóforos se sintetizan químicamente, estos no son fluorescentes en solución (Niwa *et al.*, 1996; Follenius-Wund *et al.*, 2003). Dentro del barril β el cromóforo se encuentra protegido del medio, por lo que se evita el apagamiento colisional de la fluorescencia debido a los choques moleculares con el agua, el oxígeno y otros solutos (Follenius-Wund *et al.*, 2003), además al estar dentro del barril β le da rigidez al cromóforo debido a que existen impedimentos estéricos y de cargas y sus enlaces no pueden rotar (Follenius-Wund *et al.*, 2003); esta rigidez en su estructura molecular es una característica que comparten todos los fluoróforos.

La integridad de las proteínas quiméricas EPAC-mEGFP y EPAC-Tomate también se vio beneficiada por la presencia de las proteínas fluorescentes, ya que existen reportes donde la fusión de proteínas con etiquetas como las FPs, la tiorredoxina y la glutatión transferasa, entre otras, promueven la solubilidad y el correcto plegamiento de la mayoría de las proteínas fusionadas (Makrides, 1996; Baneyx, 1999; Waldo *et al.*, 1999; Esposito & Chatterjee, 2006; Dammeyer & Tinnefeld, 2012).

El proceso de purificación fue relativamente sencillo debido a que las proteínas quiméricas tenían una etiqueta de 6 histidinas en su extremo amino. Por ello, la purificación se llevó a cabo en una columna de Ni^{2+} . Nuevamente, el color característico de las proteínas fluorescentes nos permitió seguir el proceso a simple vista y obtener una fracción concentrada de EPAC-mEGFP y EPAC-Tomate.

Lamentablemente, el caso de EPAC-tdTomate fue distinto ya que su expresión en cultivo líquido no fue exitoso, a pesar de que se veía fluorescencia de las colonias en la placa. Al momento de purificar y correr la muestra en un gel SDS-PAGE (figura 12B) nos dimos cuenta de que estaba degradada, ya que obtuvimos muchas bandas de menor peso molecular; dos de ellas correspondían al peso del CNBD de EPAC (20 kDa) y a EPAC con una sola proteína fluorescente (47 kDa).

La cuantificación de la concentración de las proteínas quiméricas se vio simplificada por el uso de las proteínas fluorescentes, ya que tienen una alta absorbancia en las longitudes de onda del rango de luz visible, lo cual nos permite determinar la concentración de las proteínas quiméricas mediante la ley de Lambert-Beer. La absorbancia la medimos en el nanodrop utilizando 1 μ l de la muestra en comparación con los 25 μ L que usamos cuando la medimos con el método de Lowry.

De manera muy particular, logramos determinar la concentración de las proteínas quiméricas en la muestra de proteínas no purificadas para posteriormente realizar los ensayos de unión a las estequiometrías establecidas. Esto sería sumamente difícil de realizar sin utilizar proteínas fluorescentes, ya que no podríamos saber la concentración real de la proteína quimérica inmersa en toda la fracción soluble de proteínas de *E. coli*.

Originalmente, el proyecto estaba planteado para EPAC-mECFP y EPAC-tdTomate, pero debido a los problemas de expresión y purificación de esta última y que los espectros de fluorescencia de tdTomate y Tomate son los mismos, decidimos hacer los ensayos de unión solamente con EPAC-Tomate y EPAC-mECFP.

Espectros de fluorescencia

Una vez que logramos expresar, purificar y cuantificar las proteínas quiméricas determinamos experimentalmente sus espectros de excitación y emisión. Esto con el fin de corroborar que la adición del CNBD al N-terminal de las proteínas fluorescentes no afectara sus espectros de fluorescencia.

La variante de CFP que usamos fue la versión monomérica de ECFP (antes llamada W1B). Una característica particular de esta proteína es que posee dos picos de excitación y dos de emisión. Los picos de excitación que obtuvimos experimentalmente fueron de 435 nm y 451 nm, mientras que en la literatura se encuentran reportados de 434 nm y 452 nm (Tsien, 1998;

Cubitt *et al.*, 1999). Para el espectro de emisión observamos un corrimiento hacia la izquierda de 4 nm para el primer pico y 9 nm para el segundo. En cuanto a los espectros de EPAC-Tomate observamos un ligero corrimiento de los picos hacia la izquierda comparados con los reportados (Shaner *et al.*, 2004), de 1 nm para el de excitación y de 5 nm para el de emisión.

Estos ligeros corrimientos de los espectros de excitación y de emisión pueden tener dos explicaciones. La primera y más plausible es que las soluciones en las que se adquirieron los espectros son distintas a las que se usaron en los artículos: para EPAC-mECFP utilizamos una solución con un pH de 7.4, mientras que Cubitt y colaboradores utilizaron una solución a pH 8.0. En el caso de EPAC-Tomate, las soluciones tienen el mismo pH, pero su composición era distinta.

La segunda explicación consiste en que la adición de la secuencia del CNBD al N-terminal de las proteínas fluorescentes modificó ligeramente su estructura tridimensional, de tal manera que algunas moléculas de agua y oxígeno de la solución pudieron acceder dentro del barril β modificando el ambiente del fluoróforo.

Estas sutiles diferencias en los picos de los espectros de EPAC-mECFP y EPAC-Tomate no afectaron la capacidad de cada uno de formar par FRET con 8-fluo-AMPC. Ya que en ambos casos se cumplió el requerimiento de que el espectro de emisión del donador se sobrepone con el espectro de excitación del aceptor (figura 14).

Ensayo de unión

El ensayo de unión desarrollado en este trabajo se basó en el fenómeno de FRET, que es la transferencia de energía por resonancia entre dos moléculas (del donador hacia el aceptor). Para que este fenómeno ocurra tienen que cumplirse tres requisitos principalmente: 1) la distancia entre los fluoróforos debe ser menor de 10 nm, 2) el espectro de emisión del donador debe superponerse con el espectro de excitación del aceptor, 3) la orientación relativa de sus dipolos (Lakowicz, 2006).

En nuestros ensayos, esperábamos que ocurriera transferencia de energía al unirse el 8-fluo-AMPC al CNBD de EPAC en la proteína quimérica, ya que de esta forma la distancia entre los dos fluoróforos se reducía a menos de 10 nm, propiciando el fenómeno de FRET. En cambio, al no haber unión entre las proteínas quiméricas y el análogo fluorescente de AMPC,

como en el caso del ensayo en presencia de competidor, ambos fluoróforos se encontrarían en la solución sin acercarse y por lo tanto no ocurriría FRET.

Primero realizamos los ensayos de unión tipo FRET con una estequiometría 1:2 de donador:aceptor (utilizando una concentración de 50 nM del donador). Como era de esperarse, en los ensayos de unión hubo transferencia de energía con ambos pares (reflejada en una reducción de la fluorescencia del donador y un incremento en la fluorescencia del acepto).

Para comprobar que esta unión era específica, utilizamos como competidor un análogo de AMPc llamado 8-CPT-AMPc, a una concentración 100 veces mayor que la del acepto para poder desplazarlo del CNBD completamente. Los resultados fueron los esperados para ambos casos, ya que vimos la recuperación de la fluorescencia del donador y una reducción en la del acepto debido a la ausencia de FRET.

Adicionalmente, también validamos la transferencia de energía entre el donador y el acepto en nuestro ensayo de unión fotoblanqueando al acepto. Este tipo de experimentos de fotoblanqueo se utiliza mucho para mediciones de FRET, en especial en microscopía de fluorescencia ya que en sistemas celulares es difícil realizar ensayos de competencia.

En nuestro ensayo de unión, una de las desventajas de usar el fotoblanqueo del acepto fue que para llegar al 50 % de fotoblanqueo del acepto se requirió demasiado tiempo (> 2 h), comparado con los experimentos de fotoblanqueo en microscopía (< 20 min) (Van Munster *et al.*, 2005). Esto se debe a que nosotros usamos una celda con un volumen de 45 μL , mientras que una célula de mamífero tiene un volumen de aproximadamente $\sim 3,000 \mu\text{m}^3$ (Zhao *et al.*, 2008; Milo *et al.*, 2010), es decir $\sim 3 \times 10^{-6} \mu\text{L}$. Además, cuando se realizan experimentos de FRET con microscopía de fluorescencia, sólo se fotoblanquea una pequeña región de la célula. Por lo tanto, el fotoblanqueo del acepto como una manera de medir FRET es útil en experimentos realizados con microscopía de fluorescencia, pero no es muy práctico para ensayos *in vitro* en una celda para espectrofluorómetro.

Al calcular la eficiencia de FRET nos dimos cuenta que el par EPAC-mECFP/8-fluo-AMPc tiene una mejor eficiencia comparada con el par 8-fluo-AMPc/EPAC-Tomate (0.75 vs. 0.35, con una estequiometría 1:2 y una concentración del donador de 50 nM). Esta diferencia en la eficiencia se debe a que 8-fluo-AMPc es un mejor acepto que Tomate, ya que su coeficiente de extinción molar ($79,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ vs. $69,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) es más grande que el de la proteína roja

fluorescente (Shaner *et al.*, 2004), por lo tanto absorbe una mayor cantidad de energía, lo que promueve el fenómeno de FRET. Además, la sobreposición del espectro de emisión del donador con el de excitación del aceptor es mayor para el par EPAC-mECFP/8-fluo-AMPC que para 8-fluo-AMPC/EPAC-Tomate.

No obstante, al realizar el ensayo con 8-fluo-AMPC y EPAC-Tomate nos percatamos que la intensidad de fluorescencia de esta combinación era mayor comparada con la del otro par FRET. Esto presenta una ventaja ya que pudimos realizar experimentos posteriores con una concentración menor de los reactivos, ya que la razón señal/ ruido es mayor cuando usamos este par FRET.

La diferencia de intensidad de fluorescencia entre pares se debió principalmente a las características espectroscópicas de la proteína fluorescente mECFP. Este fluoróforo tiene los valores más bajos de coeficiente de extinción molar ($32,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y de eficiencia cuántica (~ 0.36), comparados con los otros fluoróforos usados en este trabajo (Cubitt *et al.*, 1999; Kremers *et al.*, 2006). A pesar de ello, la combinación con el donador EPAC-mECFP resultó tener la mayor eficiencia de FRET. Por lo que se considera que este resultó ser el mejor par FRET.

Al realizar los ensayos de unión con diferentes estequiometrías de donador:aceptor (1:2, 1:5 y 1:10). Con ambos pares FRET observamos que la forma del espectro con competidor cambiaba dependiendo de la estequiometría (figura 17B), ya que existe una excitación basal del aceptor por lo que algunas moléculas del aceptor fluorescen sin que haya transferencia de energía. Este cambio en la forma del espectro parece un problema trivial si las mediciones se hacen en una celda con las concentraciones ajustadas, pero se vuelve un problema mayor si los ensayos se hacen dentro de células vivas mediante microscopía de fluorescencia, ya que no podríamos ajustar adecuadamente la estequiometría durante el ensayo.

Viendo que la eficiencia de FRET era muy alta para el par EPAC-mECFP/8-fluo-AMPC decidimos realizar unos ensayos de unión utilizando la proteína no purificada. Utilizamos las mismas condiciones que en el primer ensayo (estequiometría 1:2, con una concentración de 50 nM del donador). De nuevo, logramos ver transferencia de energía por lo que nuestro método puede ser aplicado incluso con proteína no purificada.

Es importante recalcar que logramos hacer este último ensayo con las mismas condiciones ya que pudimos calcular la concentración de la proteína quimérica mediante su absorbancia de manera muy sencilla, porque cada proteína fluorescente tiene un espectro de absorbancia particular y sus picos de absorbancia están alejados de la longitud de onda en que absorben otros compuestos dentro de la célula. La posibilidad de hacer los ensayos de unión con una proteína no purificada representa una ventaja sobre otros métodos si queremos hacer un tamizaje rápido de dominios CNBD con función desconocida.

De hecho, la prácticamente nula interferencia de otras moléculas en el medio es la más clara ventaja sobre los otros métodos (calorimetría isotérmica de titulación, resonancia plasmónica superficial, dicroísmo circular y anisotropía de fluorescencia) ya que para realizar los ensayos con todos estos métodos se necesita obtener una pureza del 90% o más de los compuestos a analizar.

9. CONCLUSIONES

- Se clonaron las construcciones EPAC-mECFP y EPAC-tdTomate. Además, obtuvimos a EPAC-Tomate como un derivado natural de EPAC-tdTomate.
- El uso del método de selección por color ofrece una gran ventaja en el momento de seleccionar colonias positivas.
- Se logró expresar y purificar exitosamente EPAC-mECFP y EPAC-Tomate, aunque EPAC-tdTomate fue inestable y se degradó en la misma condición de expresión y purificación de las otras proteínas.
- El ensayo de unión fue exitoso, lo que valida como pares FRET a EPAC-mECFP/8-fluo-AMPC y a 8-fluo-AMPC/ EPAC-Tomate.
- La eficiencia de FRET de mECFP/fluoresceína es mucho mayor que la de 8-fluo-AMPC/Tomate.
- Se logró realizar un ensayo de unión por FRET utilizando proteínas no purificadas.

10. PERSPECTIVAS

- Explorar otras condiciones de expresión para lograr obtener una fracción pura y completa de la proteína quimérica EPAC-tdTomate y determinar su eficiencia de FRET en el ensayo de unión.
- Buscar otro par FRET en el que no exista excitación basal del aceptor.
- Utilizar CNBDs que fueron predichos por el análisis bioinformático, pero que no han sido corroborados bioquímicamente.

11. REFERENCIAS

- Ai, H. & Campbell, R.E. 2007. More than just pretty colors: the growing impact of fluorescent proteins in the life sciences. *Biotechnology focus* 16–18.
- Ai, H.-W., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W. & Campbell, R.E. 2008. Fluorescent protein FRET pairs for ratiometric imaging of dual biosensors. *Nature methods* **5**: 401–3.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2008. Molecular biology of the cell. Garland Science, New York.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V & Aravind, L. 2001. Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *Journal of molecular biology* **307**: 1271–92.
- Aravind, L. & Ponting, C.P. 1997. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in biochemical sciences* **22**: 458–459.
- Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11984–11989.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology* **60**: 411–421.
- Beavo, J.A. & Brunton, L.L. 2002. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**: 710–8.
- Berman, H.M., Ten Eyck, L.F., Goodsell, D.S., Haste, N.M., Kornev, A. & Taylor, S.S. 2005. The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 45–50.
- Borjigin, M., Li, H., Lanz, N.D., Kerby, R.L., Roberts, G.P. & Poulos, T.L. 2007. Structure-based hypothesis on the activation of the CO-sensing transcription factor CoxA. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **63**: 282–7.
- Brelidze, T.I., Carlson, A.E., Sankaran, B. & Zagotta, W.N. 2012. Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel. *Nature* **481**: 530–3.

- Brelidze, T.I., Carlson, A.E. & Zagotta, W.N. 2009. Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 and hERG1 channels revealed with fluorescence and electrophysiological methods. *The Journal of biological chemistry* **284**: 27989–97.
- Bridges, D., Fraser, M.E. & Moorhead, G.B.G. 2005. Cyclic nucleotide binding proteins in the *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* genomes. *BMC bioinformatics* **6**: 6.
- Bubis, J., Neitzel, J.J., Saraswat, L.D. & Taylor, S.S. 1988. A point mutation abolishes binding of cAMP to site A in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **263**: 9668–73.
- Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7877–82.
- Caretta, A., Cavaggioni, A. & Sorbi, R.T. 1985. Binding stoichiometry of a fluorescent cGMP analogue to membranes of retinal rod outer segments. *European journal of biochemistry* **153**: 49–53.
- Caretta, A. & Saibil, H. 1989. Visualization of cyclic nucleotide binding sites in the vertebrate retina by fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology* **108**: 1517–22.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)* **263**: 802–805.
- Cheng, X., Ji, Z., Tsalkova, T. & Mei, F. 2008. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **40**: 651–662.
- Clegg, R.M. 2009. Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. Elsevier.
- Cooper, G.M. & Hausman, R.E. 2007. *The Cell A molecular Approach*. Sinauer Associates, Inc., Washington, DC.
- Craven, K.B. & Zagotta, W.N. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annual review of physiology* **68**: 375–401.

- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. & Tsien, R.Y. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in biochemical sciences* **20**: 448–55.
- Cubitt, A.B., Woollenweber, L.A. & Heim, R. 1999. Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Methods in cell biology* **58**: 19–30.
- Cukkemane, A., Grüter, B., Novak, K., Gensch, T., Bönigk, W., Gerharz, T., Kaupp, U.B. & Seifert, R. 2007. Subunits act independently in a cyclic nucleotide-activated K⁺ channel. *EMBO reports* **8**: 749–55.
- Dammeyer, T. & Tinnefeld, P. 2012. Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. *Computational and structural biotechnology journal* **3**: e201210013.
- Day, R.N. & Davidson, M.W. 2009. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society reviews* **38**: 2887–921.
- De Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**: 474–7.
- Ding, Y., Ai, H., Hoi, H. & Campbell, R.E. 2011. Förster resonance energy transfer-based biosensors for multiparameter ratiometric imaging of Ca²⁺ dynamics and caspase-3 activity in single cells. *Analytical chemistry* **83**: 9687–93.
- Dremier, S., Kopperud, R., Doskeland, S.O., Dumont, J.E. & Maenhaut, C. 2003. Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Letters* **546**: 103–107.
- Edwards, H. V., Christian, F. & Baillie, G.S. 2012. cAMP: novel concepts in compartmentalised signalling. *Seminars in cell & developmental biology* **23**: 181–90.
- Esposito, D. & Chatterjee, D.K. 2006. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current opinion in biotechnology* **17**: 353–8.
- Follenius-Wund, A., Bourotte, M., Schmitt, M., Iyice, F., Lami, H., Bourguignon, J.-J., Haiech, J. & Pigault, C. 2003. Fluorescent derivatives of the GFP chromophore give a new insight into the GFP fluorescence process. *Biophysical journal* **85**: 1839–50.

- Gruenwald, K., Holland, J.T., Stromberg, V., Ahmad, A., Watcharakichkorn, D. & Okumoto, S. 2012. Visualization of glutamine transporter activities in living cells using genetically encoded glutamine sensors. *PloS one* **7**: e38591.
- Heikaus, C.C., Pandit, J. & Klevit, R.E. 2009. Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure* **17**: 1551–7.
- Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 12501–4.
- Heim, R. & Tsien, R.Y. 1996. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current biology : CB* **6**: 178–82.
- Ho, Y.S., Burden, L.M. & Hurley, J.H. 2000. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *The EMBO journal* **19**: 5288–99.
- Hunter, T. 2000. Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**: 113–27.
- Hunyady, L., Spät, A. & Antoni, F.A. 2012. New paradigms in cAMP signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* **353**: 3–9.
- Hurley, J.H. 2003. GAF Domains: Cyclic Nucleotides Come Full Circle. *Science Signaling* **2003**: 1–3.
- Inouye, S. & Tsuji, F.I. 1994. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS letters* **341**: 277–280.
- Jayaraman, A. & Wood, T.K. 2008. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual review of biomedical engineering* **10**: 145–67.
- Joyce, M.G., Levy, C., Gábor, K., Pop, S.M., Biehl, B.D., Doukov, T.I., Ryter, J.M., Mazon, H., Smidt, H., van den Heuvel, R.H.H., Ragsdale, S.W., van der Oost, J. & Leys, D. 2006. CprK crystal structures reveal mechanism for transcriptional control of halorespiration. *The Journal of biological chemistry* **281**: 28318–25.
- Kannan, N., Wu, J., Anand, G.S., Yooseph, S., Neuwald, A.F., Venter, J.C. & Taylor, S.S. 2007. Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module. *Genome biology* **8**: R264.

- Karp, G. 2008. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. Wiley, New York.
- Kelly, S. & Price, N. 2000. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein & Peptide Science* **1**: 349–384.
- Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta* **1751**: 119–39.
- Kemp, L.R., Dunstan, M.S., Fisher, K., Warwicker, J. & Leys, D. 2013. The transcriptional regulator CprK detects chlorination by combining direct and indirect readout mechanisms. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **368**: 20120323.
- Krähling, A.M., Alvarez, L., Debowski, K., Van, Q., Gunkel, M., Irsen, S., Al-Amoudi, A., Strünker, T., Kremmer, E., Krause, E., Voigt, I., Wörtge, S., Waisman, A., Weyand, I., Seifert, R., Kaupp, U.B. & Wachten, D. 2013. CRIS-A Novel cAMP-Binding Protein Controlling Spermiogenesis and the Development of Flagellar Bending. *PLoS genetics* **9**: e1003960.
- Kremers, G.-J., Goedhart, J., van Munster, E.B. & Gadella, T.W.J. 2006. Cyan and Yellow Super Fluorescent Proteins with Improved Brightness, Protein Folding, and FRET Förster Radius. *Biochemistry* **45**: 6570–6580.
- Lakowicz, J.R. 2002. Topics in Fluorescence Spectroscopy. Principles. Kluwer Academic Publishers, New York.
- Lakowicz, J.R. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer, New York.
- Lanzilotta, W.N., Schuller, D.J., Thorsteinsson, M. V, Kerby, R.L., Roberts, G.P. & Poulos, T.L. 2000. Structure of the CO sensing transcription activator CoxA. *Nature structural biology* **7**: 876–80.
- Levy, C., Pike, K., Heyes, D.J., Joyce, M.G., Gabor, K., Smidt, H., Van Der Oost, J. & Leys, D. 2008. Molecular basis of halorespiration control by CprK, a CRP-FNR type transcriptional regulator. *Molecular Microbiology* **70**: 151–167.
- Li, X., Sui, X., Zhang, Y., Sun, Y., Zhao, Y., Zhai, Y. & Wang, Q. 2010. An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. **9**: 8549–8554.

- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., Ploegh, H. & Matsudaira, P.T. 2008. *Molecular cell biology*. WH Freeman, New York.
- Lohse, M.J., Bünemann, M., Hoffmann, C., Vilaradaga, J.-P. & Nikolaev, V.O. 2007. Monitoring receptor signaling by intramolecular FRET. *Current opinion in pharmacology* **7**: 547–53.
- Makrides, S. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* **60**: 512–538.
- Martínez, S.E., Heikaus, C.C. & Beavo, J.A. 2010. Cyclic Nucleotide-Binding GAF Domains in Phosphodiesterases and Adenylyl Cyclases. In: *Handbook of Cell Signalling*, pp. 1531–1536.
- Martínez, S.E., Wu, A.Y., Glavas, N.A., Tang, X.-B., Turley, S., Hol, W.G.J. & Beavo, J.A. 2002. The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13260–5.
- Matz, M. V, Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L. & Lukyanov, S.A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature biotechnology* **17**: 969–973.
- McKay, D.B. & Steitz, T.A. 1981. Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* **290**: 744–9.
- Milo, R., Jorgensen, P., Moran, U., Weber, G. & Springer, M. 2010. BioNumbers--the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Research* **38**: D750–D753.
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R.Y. 1999. Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 2135–40.
- Miyawaki, A., Mizuno, H., Nagai, T. & Sawano, A. 2003. Development of genetically encoded fluorescent indicators for calcium. *Methods in enzymology* **360**: 202–25.
- Miyawaki, A. & Tsien, R.Y. 2000. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods in Enzymology* **327**: 472–500.

- Mucignat-Caretta, C. & Caretta, A. 1997. Binding of two fluorescent cAMP analogues to type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases. *Biochimica et biophysica acta* **1357**: 81–90.
- Nelson, D. & Cox, M. 2005. *Lehninger principios de bioquímica*. Omega.
- Niino, Y., Hotta, K. & Oka, K. 2010. Blue fluorescent cGMP sensor for multiparameter fluorescence imaging. *PloS one* **5**: e9164.
- Nikolaev, V.O., Bünemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. & Lohse, M.J. 2004. Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *The Journal of biological chemistry* **279**: 37215–8.
- Nishigaki, T. & Treviño, C.L. 2012. Study of protein-protein interactions by fluorescence spectroscopy. In: *Tools to Understand Protein-Protein Interactions* (I. Gómez, ed), pp. 87–100.
- Niwa, H., Inouye, S., Hirano, T., Matsuno, T., Kojima, S., Kubota, M., Ohashi, M. & Tsuji, F.I. 1996. Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 13617–22.
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392–1395.
- Piston, D.W. & Kremers, G.-J. 2007. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in biochemical sciences* **32**: 407–14.
- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkruis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W.H., Bos, J.L. & Jalink, K. 2004. Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO reports* **5**: 1176–80.
- Popovych, N., Tzeng, S.R., Tonelli, M., Ebright, R.H. & Kalodimos, C.G. 2009. Structural basis for cAMP-mediated allosteric control of the catabolite activator protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 6927–32.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229–233.

- Puljung, M.C. & Zagotta, W.N. 2013. A secondary structural transition in the C-helix promotes gating of cyclic nucleotide-regulated ion channels. *The Journal of biological chemistry* **288**: 12944–56.
- Rasooly, A. & Herold, K.E. 2009. Biosensors and Biodetection. *Methods and Protocols*.
- Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. 2006. Structure of the cyclic-AMP-responsive exchange factor Epac2 in its auto-inhibited state. *Nature* **439**: 625–8.
- Rehmann, H., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. 2007. Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**: 63–73.
- Ribeiro, S.C., Oliveira, P.H., Prazeres, D.M.F. & Monteiro, G.A. 2008. High frequency plasmid recombination mediated by 28 bp direct repeats. *Molecular biotechnology* **40**: 252–60.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C.P. 1998. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5857–64.
- Schultz, J.E. 2009. Structural and biochemical aspects of tandem GAF domains. In: *Handbook of experimental pharmacology* (H. H. H. W. Schmidt, F. Hofmann, & J.-P. Stasch, eds), pp. 93–109.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N.G., Palmer, A.E. & Tsien, R.Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein. *Nature biotechnology* **22**: 1567–72.
- Shimomura, O. 1979. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letters* **104**: 220–222.
- Shimomura, O. 2009. Discovery of Green Fluorescent Protein (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **48**: 5590–5602.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga, Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology* **59**: 223–239.

- Shu, X., Shaner, N.C., Yarbrough, C.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. 2006. Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry* **45**: 9639–47.
- Stahelin, R. V. 2013. Surface plasmon resonance: a useful technique for cell biologists to characterize biomolecular interactions. *Molecular biology of the cell* **24**: 883–6.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology* **189**: 113–30.
- Tengholm, A. 2007. Cyclic AMP: swing that message! *Cellular and molecular life sciences* **64**: 382–5.
- Tresguerres, M., Levin, L.R. & Buck, J. 2011. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney international* **79**: 1277–88.
- Tsalkova, T., Mei, F.C. & Cheng, X. 2012. A fluorescence-based high-throughput assay for the discovery of exchange protein directly activated by cyclic AMP (EPAC) antagonists. *PLoS one* **7**: e30441.
- Tsien, R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* **67**: 509–44.
- Tsien, R.Y. 2009. Constructing and Exploiting the Fluorescent Protein Paintbox (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **48**: 5612–5626.
- Van der Krogt, G.N.M., Ogink, J., Ponsioen, B. & Jalink, K. 2008. A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example. *PLoS one* **3**: e1916.
- Van Munster, E.B., Kremers, G.J., Adjobo-Hermans, M.J.W. & Gadella, T.W.J. 2005. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement by gradual acceptor photobleaching. *Journal of Microscopy* **218**: 253–262.
- Visser, N.F.C., Scholten, A., Van Den Heuvel, R.H.H. & Heck, A.J.R. 2007. Surface-plasmon-resonance-based chemical proteomics. *ChemBioChem* **8**: 298–305.
- Vogel, S.S., Thaler, C. & Koushik, S. V. 2006. Fanciful FRET. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* **2006**: re2.
- Waldo, G.S., Standish, B.M., Berendzen, J. & Terwilliger, T.C. 1999. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature biotechnology* **17**: 691–5.

- Wall, M.A., Socolich, M. & Ranganathan, R. 2000. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nature structural biology* **7**: 1133–8.
- Ward, W.W., Cody, C.W., Hart, R.C. & Cormier, M.J. 1980. Spectrophotometric Identity of the Energy Transfer Chromophores in *Renilla* and *Aequorea* Green-Fluorescent Proteins. *Photochemistry and Photobiology* **31**: 611–615.
- Won, H.S., Lee, Y.S., Lee, S.H. & Lee, B.J. 2009. Structural overview on the allosteric activation of cyclic AMP receptor protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1794**: 1299–1308.
- Xu, X., Vysotskaya, Z. V, Liu, Q. & Zhou, L. 2010. Structural basis for the cAMP-dependent gating in the human HCN4 channel. *The Journal of biological chemistry* **285**: 37082–91.
- Yang, F., Moss, L.G. & Phillips, G.N. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **14**: 1246–1251.
- Zaccolo, M., Magalhães, P. & Pozzan, T. 2002. Compartmentalisation of cAMP and Ca²⁺ signals. *Current Opinion in Cell Biology* **14**: 160–166.
- Zaccolo, M. & Pozzan, T. 2002. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science (New York, N.Y.)* **295**: 1711–5.
- Zagotta, W.N., Olivier, N.B., Black, K.D., Young, E.C., Olson, R. & Gouaux, E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* **425**: 200–205.
- Zhao, L., Kroenke, C.D., Song, J., Piwnica-Worms, D., Ackerman, J.J.H. & Neil, J.J. 2008. Intracellular water-specific MR of microbead-adherent cells: the HeLa cell intracellular water exchange lifetime. *NMR in Biomedicine* **21**: 159–164.
- Zheng, J. & Trudeau, M.C. 2015. Handbook of ion channels. CRC Press, New York.

12. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

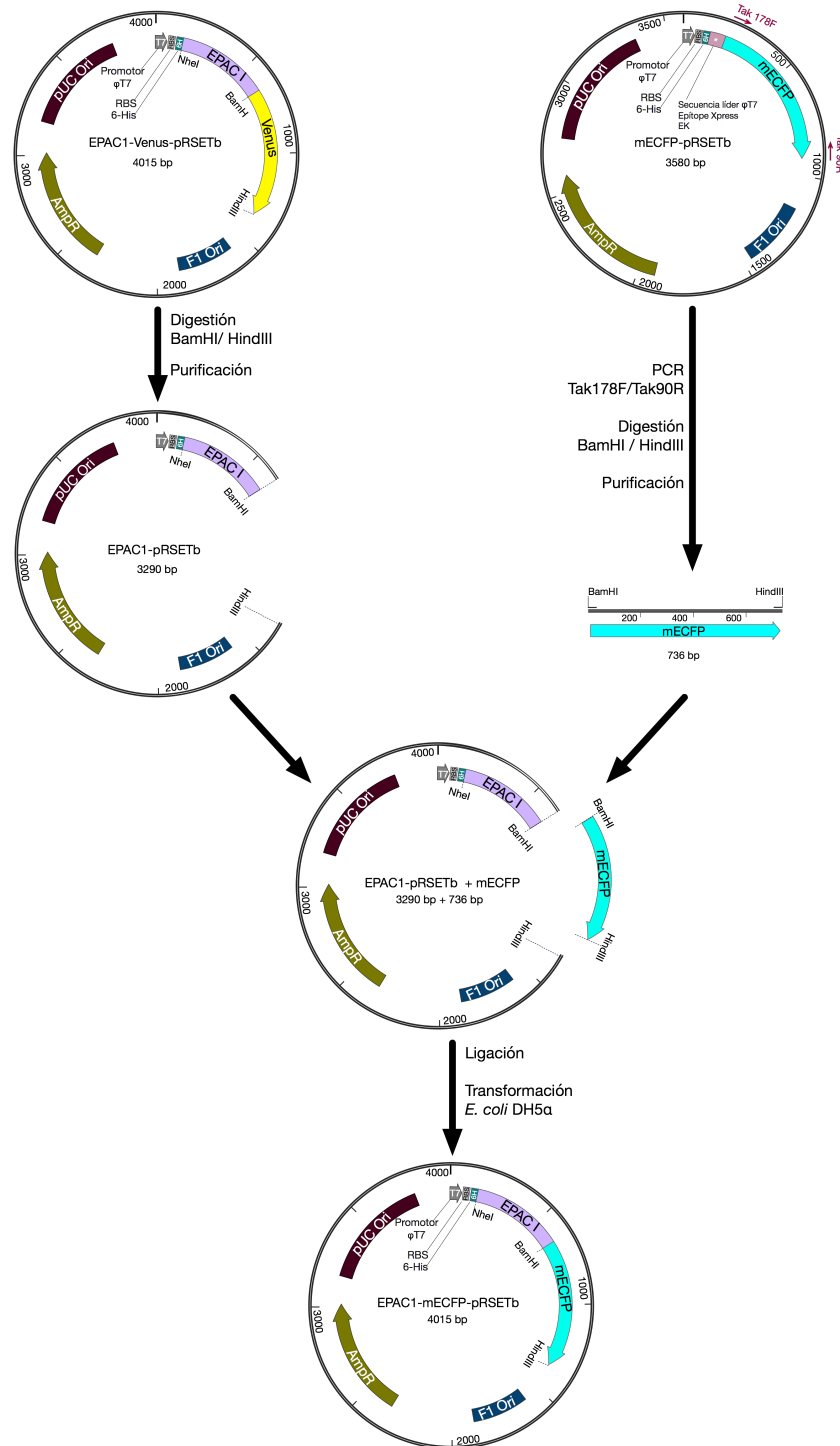


Figura suplementaria 1. Diseño de la construcción EPAC I- mECFP. Se usó como base el plásmido EPAC I-Venus-pRSETb, el cual codifica para la proteína quimérica 6His-CNBD de EPAC I-145cp Venus. Esta proteína se encuentra bajo el promotor del fago T7. El plásmido se digirió con las enzimas BamHI y HindIII, y se purificó la banda que contenía la secuencia de EPAC I junto con el vector pRSETb (EPAC I-pRSETb). La secuencia de mECFP se amplificó con oligonucleótidos específicos del plásmido mECFP-pRSETb, que insertaban los sitios BamHI y HindIII en el extremo 5' y 3' del gen, respectivamente. Se digirió con dichas enzimas para ligarlo con EPAC I-pRSETb. El plásmido ligado de EPAC I-mECFP-pRSET se transformó en la cepa DH5 α y se seleccionaron las colonias positivas como indica la sección de métodos. (RBS, sitio de unión a ribosoma; ϕ T7, fago T7; EK, sitio de corte para la enterocinasa).

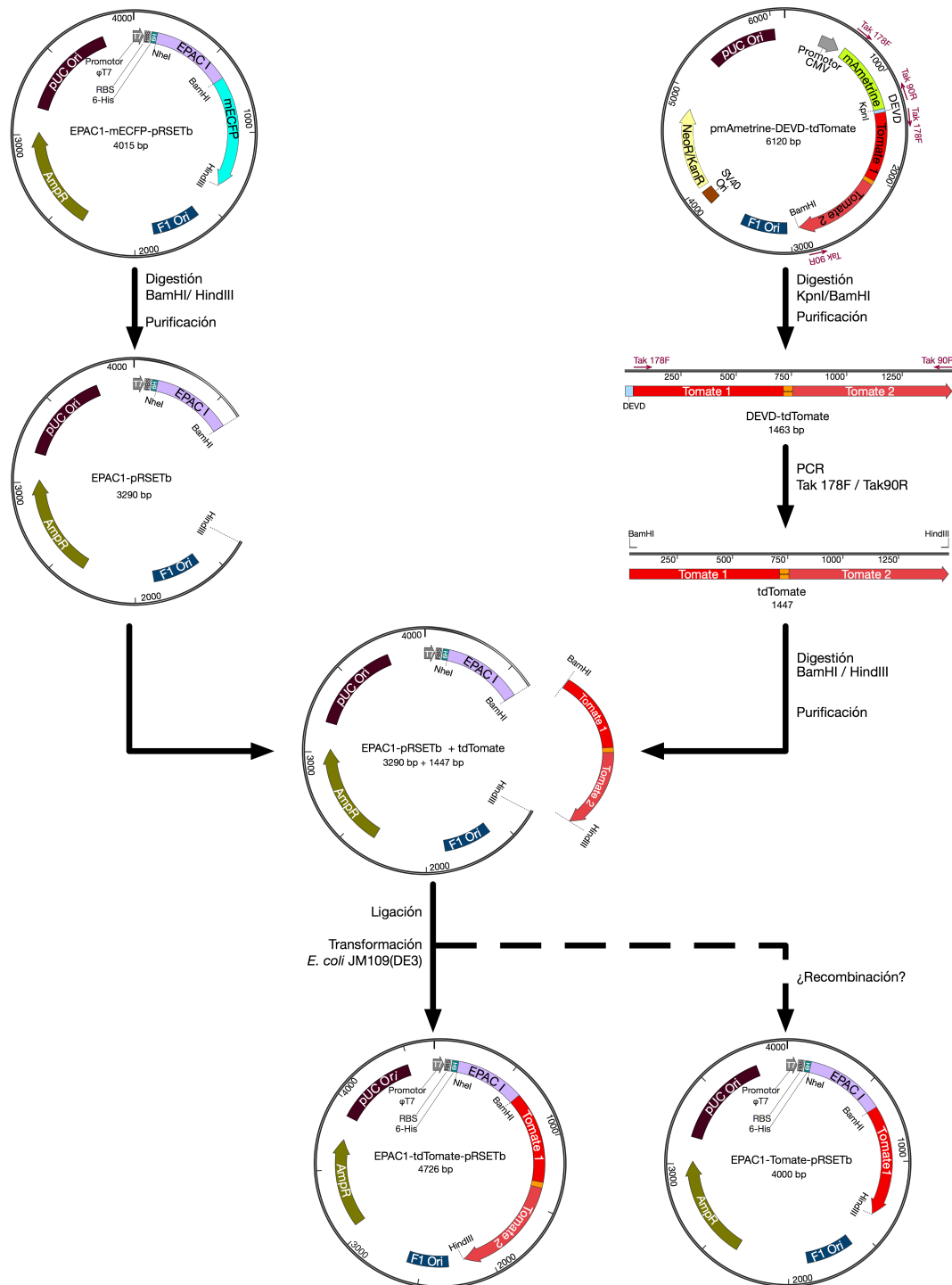


Figura suplementaria 2. Diseño de la construcción EPAC I- tdTomate y EPAC I-Tomate Para el diseño de la construcción 6His-CNBD de EPAC I- tdTomate (EPAC-tdTomate) se utilizó como vector base a EPAC I-mECFP-pRSETb, el cual se digirió con las enzimas *BamHI* y *HindIII* para obtener a EPAC I-pRSETb. La secuencia que codifica a tdTomate la obtuvimos del plásmido pmAmetrine-DEVD-tdTomate. Este plásmido codifica para dos proteínas fluorescentes distintas, mAmetrine y tdTomate. Por lo que los oligonucleótidos diseñados para añadir los sitios *BamHI* y *HindIII* hibridarían con ambas secuencias. Por ello, primero digerimos este plásmido con las enzimas *KpnI* y *BamHI*. De esta manera aislamos la secuencia de tdTomate para realizar los PCR. El producto lo digerimos con las enzimas *BamHI* y *HindIII* para ligarlo con EPAC I-pRSETb. El plásmido ligado lo transformamos en las células JM109 (DE3) para poder realizar la selección por color (figura 11A). Al analizar los plásmidos obtenidos por secuenciación y patrón de digestión nos percatamos que teníamos a EPAC I-tdTomate-pRSETb y a EPAC I-Tomate-pRSETb, el cual posiblemente fue producto de una recombinación homóloga dentro de la bacteria. (RBS, sitio de unión a ribosoma; ϕ T7, fago T7).

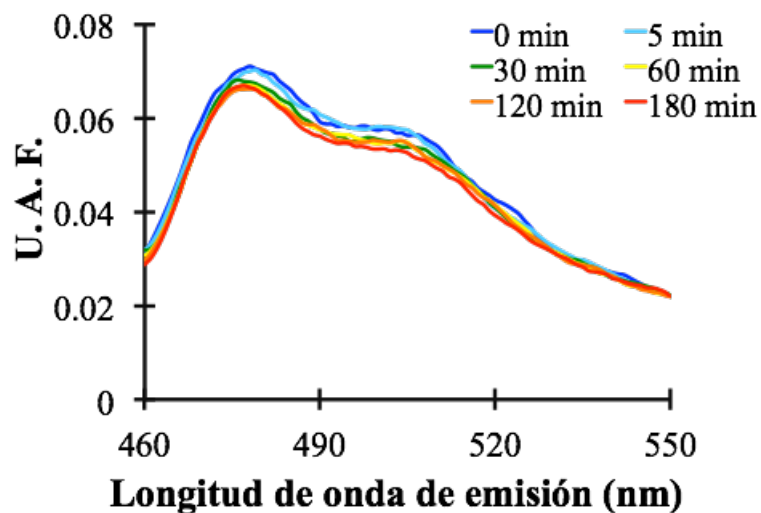


Figura suplementaria 3. La irradiación de EPAC-mECFP con el LED verde Luxeon™ no compromete la integridad del fluoróforo de la proteína fluorescente. Como control para el ensayo de fotoblanqueo (figura 16), se trató de fotoblanquear al donador con el LED verde usado para el ensayo. Este LED emite en un rango de 510 nm – 530 nm, por lo que su luz no es absorbida por mECFP (donador), pero sí por 8-fluo-AMPc (aceptor).