



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS
CONSTRUIDAS A PARTIR DE UNA PROTEÍNA FLUORESCENTE Y DE UN
DOMINIO DE UNIÓN A NUCLEÓTIDOS CÍCLOCOS. UN INTENTO PARA
DESARROLLAR UN NUEVO SENSOR FLUORESCENTE PARA EL AMPc.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
JUAN ESTEBAN MONROY LARA

Dr. TAKUYA NISHIGAKY SHIMISU
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Dr. ENRIQUE SALAS VIDAL
Dr. IGNACIO LOPEZ GONZALEZ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt, UNAM) gracias al financiamiento de los donativos PAPIIT DGAPA (IN203513, IN221110, IN211907) y CONACYT (177138, 56660).

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis compañeros del laboratorio Yolo, Carmen y a mi amigo Omar, por todos los momentos vividos.

A mi director Dr. Takuya por toda la paciencia y apoyo a pesar de los problemas que llegue a tener, para terminar.

A mis padres por todo su apoyo incondicional y a mis hermanos por haber estado conmigo siempre.

A mi esposa Mayra por la paciencia, compañía, apoyo total que me ha brindado.

A mi hija por haber luchado tanto para seguir con nosotros, y ser un ejemplo de tenacidad, valor y fuerza.

INDICE

I. ABREVIACIONES.	3
II. RESUMEN.	6
1. INTRODUCCIÓN.	8
1.1 El AMPc y su regulación.....	8
1.2 Proteínas involucradas en síntesis, degradación y señalización del AMPc.....	9
1.2.1 Adenilato ciclasa.....	9
1.2.2 Fosofodiesterasa (PDE).....	10
1.2.3 La proteína cinasa dependiente de AMPc.....	11
1.2.4 La proteína reguladora de proteínas G pequeñas dependientes de AMPc (EPAC).....	12
1.2.5 Canales regulados por nucleótidos cíclicos (Canales CNG).....	13
1.2.6 Canales regulados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (Canales HCN).....	13
1.3 El dominio de unión a nucleótido cíclico (CNBD).....	14
1.4 Importancia del AMPc en la función del espermatozoide.....	15
1.4.1 La regulación de la movilidad en el espermatozoide.....	16
1.4.2 La Capacitación.....	17
1.4.3 La reacción acrosomal (RA).....	17
2. ANTECEDENTES.	18
2.1 Los métodos para medir la concentración de AMPc.....	18
2.2 Métodos para medir cambios espacio-temporales del AMPc en células.....	18
2.3 Indicador de AMPc fluorescente tipo FRET.....	18
2.4 Sensores fluorescentes basados en una sola GFP.....	21
2.4.1 La proteína verde fluorescente (GFP).....	21
2.4.2 Sensores fluorescentes para nucleótidos cíclicos basados en cpFP.....	26
3. HIPÓTESIS.	27
4. OBJETIVOS.	27
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	28
5.1 Material.....	28
5.2 Métodos.....	29
6. RESULTADOS.	35
6.1 Diseño del sensor fluorescente para AMPc.....	35
6.1.1 cpVenus.....	35
6.1.2 El CNBD del canal SpHCN2.....	36
6.1.3 Construcción de las proteínas quiméricas.....	37

6.2 Preparación de los plásmidos que codifican las proteínas quiméricas.....	38
6.3 Expresión y purificación de las proteínas quiméricas.....	39
6.4 Determinación del espectro de fluorescencia de las proteínas en presencia de AMPc. ...	40
6.5 Determinación del espectro de fluorescencia de las proteínas.	42
6.6 Eficiencia cuántica (ϕ) de las proteínas.	44
6.7 Ensayo de unión del AMPc al CNBD por anisotropía.	45
7. DISCUSIÓN.....	47
7.1 Expresión de las proteínas modificadas y su purificación.	47
7.2 Efecto del AMPc sobre la fluorescencia de las proteínas quiméricas.....	47
7.3 Propiedad espectroscópica de las proteínas expresadas.....	49
7.4 Eficiencia cuántica de las proteínas expresadas.	51
7.5 Ensayo de unión del AMPc mediante la técnica de anisotropía.	52
8. CONCLUSIÓN.....	54
9. PERSPECTIVAS.....	55
REFERENCIAS.....	56

I. ABREVIACIONES.

ADP	Adenosin difosfato.
AKAP	Proteína de anclaje de la PKA.
AMPc	3', 5' Adenosin Monofosfato cíclico.
APS	Persulfato de amonio
ATP	Adenosina trifosfato.
BFP	Proteína azul fluorescente
C- terminal	Carboxilo terminal.
Ca ²⁺	Calcio
CFP	Proteína cian fluorescente.
Cl ⁻	Cloro
CNBD	Dominio de unión a nucleótido cíclico.
CNG	Canales regulados por nucleótidos cíclicos.
cpGFP	Permutación circular de la proteína verde fluorescente.
DAG	Diacil glicerol.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetra acético
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada.

EPAC	Proteína reguladora de proteínas G pequeñas dependiente de AMPc
FRET	Trasferencia de energía resonante de Förster.
GAF	Dominio nombrado por algunas proteínas donde se encuentra: fosfodiesterasas específicas para GMPc, adenilato ciclasa y FhIA.
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente.
GMPc	3', 5' guanosin monofosfato cíclico.
HCN	Canal dependiente de hiperpolarización y nucleótidos cíclicos.
HCO ₃ ⁻	Ion carbonato
IP ₃	Inositol trifosfato
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertoni
Ni ²⁺	Níquel
nm	Nanómetros
N-terminal	Amino terminal.
PDE	Fosfodiesterasa
PIP2	Fosfoinositol bifosfato
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc.
PPM	Péptido penetrador de membrana
R	Valor de anisotropía.

RNA	Ácido ribonucleico.
sAC	Adenilato ciclasa soluble.
SpHCN	Canal dependiente de hiperpolarización y nucleótidos cíclicos de erizo <i>Strogelocentrotus purpuratus</i>
tmAC	Adenilato ciclasa transmembranal.
U.A.F	Unidades arbitrarias de fluorescencia
YFP	Proteína amarilla fluorescente.

II. RESUMEN.

El AMPc es un segundo mensajero que modula varias funciones celulares. Entre sus principales proteínas efectoras se encuentra PKA, EPAC, canales tipo CNG y HCN. Este mensajero se produce por varios tipos de adenilato ciclasas y su concentración es regulada negativamente por diversos tipos de fosfodiesterasas. El efecto del AMPc está dado por medio de microdominios celulares con lo que se pueden generar respuestas específicas a estímulos distintos usando el mismo segundo mensajero. Por lo anterior, es importante medir los cambios en concentración espacio temporales del AMPc que ocurren en la célula, para esto, se han desarrollado sensores fluorescentes para el AMPc basados en FRET (transferencia de energía entre fluoróforos cercanos). Dichos sensores han sido muy útiles pero poseen ciertas desventajas; una de ellas es su gran tamaño, y otra es la posible interferencia de FRET intramolecular (la función de sensor) por FRET intermolecular (entre otras moléculas del mismo sensor) en caso de una alta densidad del sensor debido a una sobre expresión local como en la membrana plasmática.

Con base en lo anterior intenté desarrollar un sensor basado en una permutación circular de una proteína fluorescente (cpFP), utilizando la idea desarrollada por Nauch y sus colaboradores en el 2008 para medir los cambios en el GMPc. El sensor de Nauch consiste en la fusión de una cpFP a una región de PKG que contiene dos dominios de unión a nucleótido cíclico (CNBD). Para este trabajo, utilicé una región del CNBD del canal SpHCN2 (un homólogo del canal SpHCN1 obtenido del erizo de mar; *Strongylocentrotus purpuratus*), y 6 cpFPs de la proteína Venus (una proteína amarilla fluorescente) para probar 6 diferente proteínas quiméricas. Las seis cpFPs que utilicé (cpVenus) tienen los nuevos N terminales de la posición de los aminoácidos 145 a la 150 (cp145-cp150), en los cuales se encuentra la histidina 148 que se sabe, interactúa directamente con el fluoróforo de la proteína Venus; e influye en las propiedades de fluorescencia.

Las construcciones que obtuve (6 proteínas quiméricas) logré expresarlas en la bacteria *E. coli*, pero ninguna de ellas mostró cambio en la fluorescencia en presencia del AMPc.

Para averiguar si la inserción de un dominio externo afectó el microambiente del fluoróforo de la proteína Venus de manera diferente de acuerdo a la posición de la inserción, caractericé espectroscópicamente todas las proteínas expresadas (6 cpVenus sin el CNBD y 6 proteínas con el CNBD). Noté que el coeficiente de extinción molar (ϵ , eficiencia de excitación) y la eficiencia cuántica (Φ) fueron afectados de manera diferente

en cada proteína. En general, el ϵ y la Φ disminuyeron en relación a Venus, la proteína fluorescente original. Notablemente, la inserción del dominio CNBD afectó solamente el ϵ de las proteínas, no la Φ . Es decir que los valores del ϵ de las cpVenus (145-150) se modificaron por la inserción del dominio CNBD. Por otro lado, los valores de la Φ fueron prácticamente iguales entre proteínas con y sin el dominio CNBD. Esto podría indicar que los 4 aminoácidos (DPTM: que corresponde al sitio de BamHI), que se encuentran en el N terminal de cada cpVenus, independientemente de la inserción del dominio CNBD, determinaron la Φ de los fluoróforos. Considerando que el movimiento giratorio del grupo fenol del fluoróforo es importante para de la propiedad de fluorescencia, estos 4 aminoácidos posiblemente limitaron la libertad del movimiento giratorio de este grupo (Figura 1A).

A pesar de que la inserción del dominio CNBD del SpHCN2 afectó los valores del ϵ de las cpVenus (145-150), el AMPc no causó ningún cambio en la fluorescencia. Para explicar estos resultados, averigüé la capacidad de la unión específica del dominio CNBD al AMPc mediante un ensayo de unión. Utilicé un análogo fluorescente de AMPc (8- $[\phi$ -575]-AMPc) y medí el cambio en la anisotropía en presencia de las proteínas. Mientras que proteínas que contienen el dominio CNBD de EPAC1 incrementaron el valor de anisotropía de 8- $[\phi$ -575]-AMPc de manera específica, las proteínas que contienen el CNBD del SpHCN2 no incrementaron el valor de anisotropía, indicando que el CNBD del SpHCN2, por lo menos expresado en *E. coli*, no tiene la actividad de unirse al AMPc.

Por lo anterior, preparé una proteína quimérica usando el CNBD de EPAC1 y cp145Venus. Desafortunadamente, esta proteína tampoco mostró un cambio en la fluorescencia en presencia de AMPc, aunque sí mostró actividad de unión al AMPc.

En este proyecto utilicé BamHI, una enzima cuyo sitio de restricción se encuentra en el N terminal de las cpVenus en los plásmidos originales, para construir proteínas quiméricas con los dominios CNBD. En consecuencia, todas las cpVenus tuvieron los mismos 4 aminoácidos (DPTM) en sus N terminales, los cuales fueron el determinante de las bajas eficiencias cuánticas de las proteínas y posiblemente de la deficiencia para un sensor funcional. Por lo anterior, para obtener un sensor funcional usando la misma estrategia del presente proyecto, es importante variar aminoácidos que funcionan como entrecruzadores de las proteínas usando diferentes enzimas de restricción u otros métodos como mutación por PCR reverso.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 El AMPc y su regulación.

Los segundos mensajeros son moléculas pequeñas que funcionan como intermediarios de la señalización celular este grupo incluye al Ca^{2+} , el 3', 5'AMP cíclico (AMPc), 3',5'GMP cíclico (GMPc), el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), monóxido de nitrógeno (NO), 1,2-diacilglicerol (DAG) y fosfoinositidos como el PIP2 y PIP3. Todas estas moléculas modulan la actividad de diversas proteínas como cinasas.

El AMPc es un segundo mensajero celular muy importante y modula una amplia variedad de procesos biológicos como: metabolismo celular, expresión génica, división celular, migración, exocitosis y respuesta inmune. Para poder explicar cómo un único segundo mensajero puede modular diferentes eventos de una manera específica, se ha propuesto que hay una segregación espacial en la ruta de señalización del AMPc dentro de la célula. La vía de señalización del AMPc se basa en la organización de complejos macromoleculares (Beavo y Brunton, 2002) formados por la adenilato ciclasa (AC), fosfodiesterasa (PDE) y los blancos del AMPc, como la cinasa dependiente de AMPc (PKA), activador de proteína G dependiente de AMPc (EPAC) y canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos (CNG y HCN) (Rehmann *et al.*, 2006). Estas moléculas se encuentran en microdominios específicos en la célula donde realizan algunas tareas biológicas particulares (Tasken and Aandahl, 2004; Zaccolo and Pozzan, 2002)(Figura 1-1).

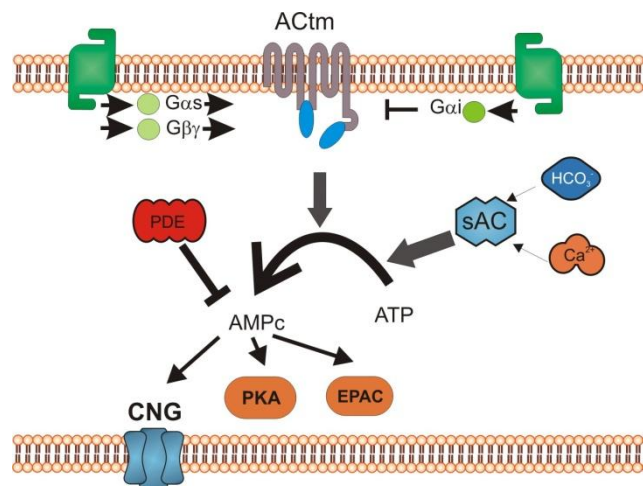


Figura 1-1. Vía de acción del AMPc. El AMPc es producido por la adenilato ciclasa, que puede ser de dos tipos: transmembranal (tmAC) ó soluble (sAC). Este segundo mensajero regula a tres tipos principales de proteínas: la PKA, los canales CNG y HCN y la proteína EPAC. El AMPc se degrada a 5'AMP por las fosfodiesterasas (PDE).

1.2 Proteínas involucradas en síntesis, degradación y señalización del AMPc.

1.2.1 Adenilato ciclasa.

La adenilato ciclasa (AC) es una enzima que sintetiza AMPc usando ATP como sustrato. Existen dos clases de AC: la transmembranal (tmAC) y la soluble (sAC) (Figura 1-2). La tmAC es la ciclasa clásica que tiene 12 segmentos transmembranales. Existen 9 genes de tmAC en mamíferos (tmAC1-9) y se encuentra algún tipo de tmAC en casi todas las células. Las hormonas o neurotransmisores regulan la actividad de tmAC a través de las proteínas G. Se sabe que la forskolina, un componente de la planta *Coleus forskohlii*, activa directamente las tmACs.

Por otro lado, la adenilato ciclasa soluble (sAC) es una ciclasa que se ha encontrado en el espermatozoide y su estructura y modo de regulación son distintos a las tmACs. La sAC no tiene segmentos transmembranales y se localiza en el citoplasma asociándose a varios compartimentos subcelulares (Zippin et al., 2004). La sAC estructuralmente y funcionalmente se parece a las ACs de cianobacterias y se activa por bicarbonato (HCO_3^-) y Ca^{2+} en vez de proteína G o forskolina (Chen et al., 2000).

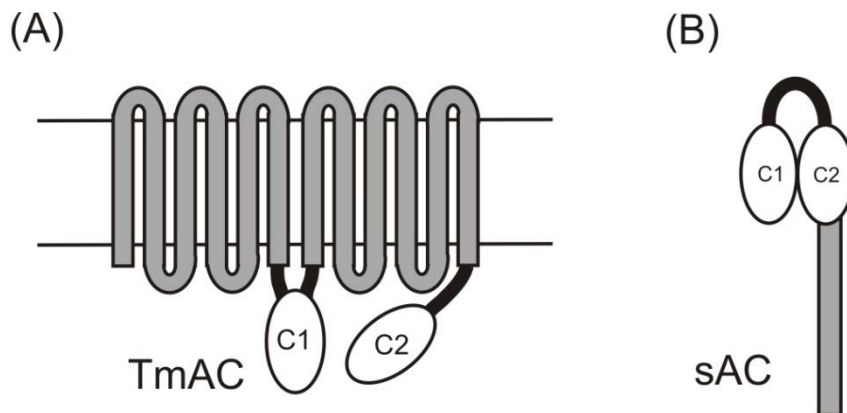
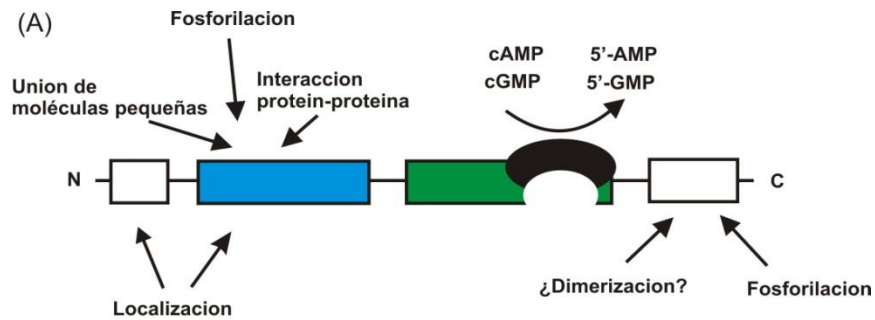


Figura 1-2. Estructura de la enzima adenilato ciclasa. Hay dos tipos principales de adenilato ciclasas. Las transmembranales (tmAC) y la soluble (sAC). Ambas poseen dos regiones catalíticas C1 y C2. Las transmembranales además poseen doce regiones que atraviesan la membrana celular dándoles su nombre. En el panel **A** se muestra la tmAC, la cual posee doce segmentos transmembranales (Tm) y dos subunidades catalíticas (C1 y C2). La C1 se localiza después del sexto Tm y la C2 se queda en el C terminal. En el panel **B**, se muestra la sAC, la cual no posee segmentos transmembranales. La sAC es independiente de proteínas G; en lugar de eso es modulada por HCO_3^- . Posee las dos regiones catalíticas y una región consenso para un P loop de unión a fosfato que le permite interactuar con nucleótidos, Modificado de Kamenetsky et al., 2006.

1.2.2 Fosfodiesterasa (PDE).

La fosfodiesterasa (PDE) hidroliza el enlace fosfodiéster de AMPc (o GMPc) y produce 5'-AMP (o 5'-GMP). Se sabe que en el humano existen 24 genes que codifican PDEs y se han clasificados en 11 familias (PDE1-11) dependiendo de la especificidad al sustrato (AMPc/GMPc) y el modo de regulación (Figura 1-4) (Mehats et al., 2002). Las familias 2, 5, 6, 10 y 11 poseen un dominio llamado GAF, el cual funciona como receptor a nucleótidos cíclicos, regulando la actividad de la enzima al cambiar su estructura cuando se une al nucleótido cíclico. Existe otro dominio de unión a nucleótidos cíclicos, CNBD (del inglés "Cyclic Nucleotide-Binding Domain") en PKAs, EPACs, canales CNG y canales HCN. El CNBD también funciona como un dominio regulatorio de cada proteína. Los dominios GAF y CNBD tienen la función muy similar aunque la secuencia de amino ácidos y su estructura son distintas.



(B)

Familia	Estimulada por:	Inhibidores específicos	Sensibilidad al IBMx
PDE1	Estimulada por Ca ²⁺ + CaM	IBMX, fenotiazinas	+
PDE2	Estimulada por GMPc	EHNA	+
PDE3	Inhibida por GMPc	Clistomida, milrinona	+
PDE4	Específica a AMPc	Rolipram, roflumilast, cilomilast	+
PDE5	Específica a GMPc	Zaprinast, silendafil	+
PDE6	Específica a GMPc	-	+
PDE7	Alta afinidad por AMPc	-	+
PDE8	Alta Afinidad por AMPc	-	-
PDE9	Alta afinidad por GMPc	-	-
PDE10	Sustrato dual	-	+
PDE11	Sustrato dual	-	+

Figura 1-4. Estructura general de la familia de las fosfodiesterasas. (A) Las fosfodiesterasas comparten una estructura común; un dominio catalítico conservado (verde) y flanqueado por dominios regulatorios (azul), y los C y N terminal. Estos dominios regulatorios son específicos de cada familia e incluyen sitios de fosforilación, sitios de unión a pequeños ligandos, dominios de unión a membrana y dominios de interacción proteína-proteína. (B) En esta tabla se muestra las características de las diferentes familias de las fosfodiesterasas, así como qué moléculas las estimulan e inhiben específicamente, además de la sensibilidad de éstas por el inhibidor de PDEs IBMx. Modificado de Mehats et al., 2002.

1.2.3 La proteína cinasa dependiente de AMPc.

La PKA es una cinasa de serina y treonina que se activa por AMPc. En la condición basal, la PKA existe como un tetrámero que consta de dos subunidades catalíticas (C) unidas a un dímero de la subunidad reguladora (R) (Figura 1-5). La subunidad R funciona como un dominio inhibitorio de la subunidad C, lo que indica que el tetrámero es la forma inactiva. La subunidad R comprende un dominio de dimerización (DD) en el N-terminal, y es responsable de la unión a las proteínas de anclaje para cinasas-A (AKAPs). AKAP es una familia de proteínas de multiandamiaje, la cual determina la localización de PKA en un sitio particular de la célula. Seguido del dominio DD, hay una región flexible que se une al sitio activo de la subunidad C y funciona como un inhibidor. En el C-terminal de la subunidad R, hay dos dominios de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). Las subunidades C se disocian de la subunidad R y se convierte a la forma activa cuando el AMPc se une al CNBD (Tasken and Aandahl, 2004).

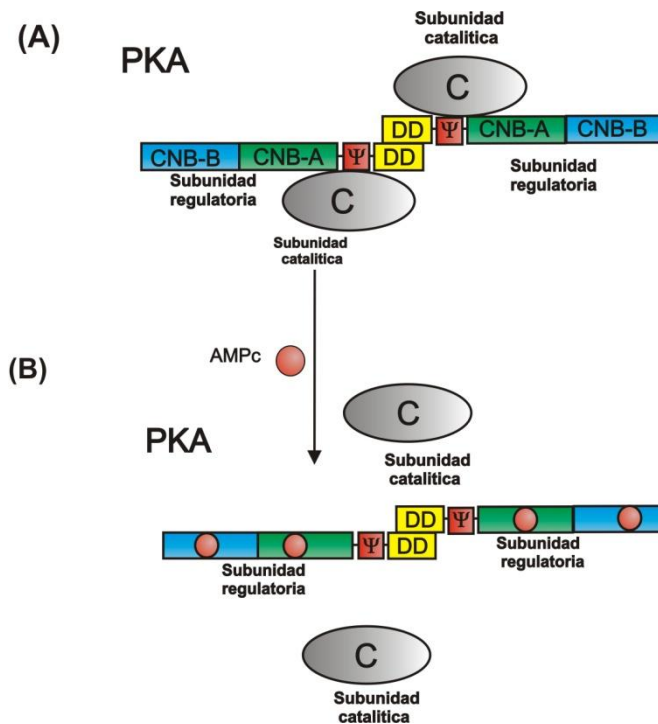


Figura 1-5. Estructura de PKA. La subunidad reguladora consiste en un dominio de dimerización (DD), una secuencia de pseudo-sustrato (Ψ), y los dominios de unión a nucleótidos cíclicos (CNB-A y CNB-B). C marca la subunidad catalítica. La unión del AMPc induce la disociación de la subunidad catalítica, la cual es activada y liberada del complejo, lo que le permite interactuar con sus proteínas blanco.

1.2.4 La proteína reguladora de proteínas G pequeñas dependientes de AMPc (EPAC).

EPAC es un factor de intercambio de nucleótidos, GEF (del inglés “Guanine nucleotide Exchange Factor”), es decir, intercambia GDP por GTP en proteínas G. EPAC modula a las proteínas G pequeñas Rap1 y Rap2. El N-terminal de la proteína EPAC1 consta de un dominio CNBD similar al que posee la subunidad R de la PKA, y un dominio DEP que permite su anclaje a las membranas celulares.

En el C-terminal, se encuentra un dominio catalítico que es característico de los factores de intercambio para la familia de GTPasas Ras (Figura 1-6). En bajos niveles del AMPc, EPAC está en una conformación inactiva impidiendo la unión con Rap. Cuando se une el AMPc al CNBD, EPAC cambia de conformación y permite que se una Rap. EPAC2 tiene dos dominios CNBD (A y B), aunque se ha reportado que la eliminación del primer CNBD (A) no altera la actividad de EPAC2 (Rehmann et al., 2006; Rehmann et al., 2007)).

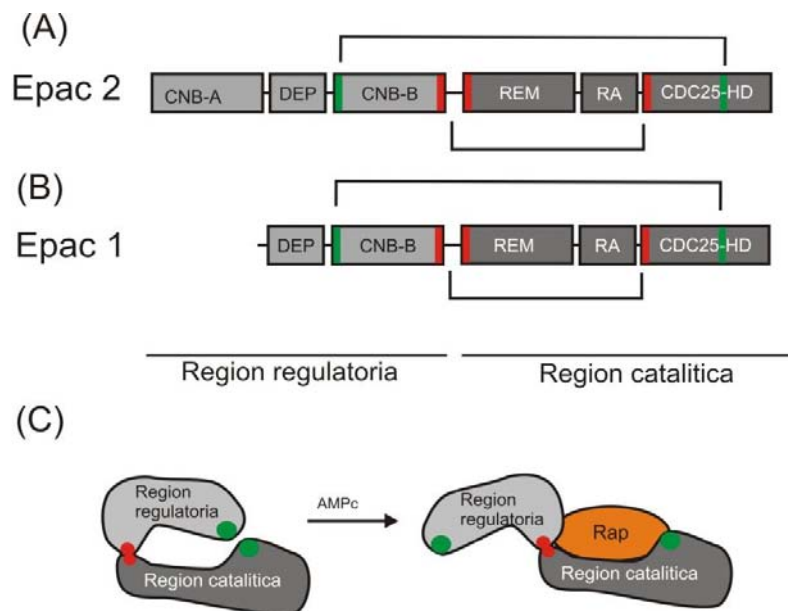


Figura 1-6. Estructura de EPAC. Estructura de los dos miembros de la familia de EPAC. Estas proteínas están compuestas de dos regiones principales: la región reguladora y al región catalítica. En la región reguladora se encuentra el dominio de unión a nucleótido cíclico. El CNB-B es común en Epac 1 y 2 y es suficiente para mantener inactivo a EPAC (paneles A y B). El CNB-A es exclusivo de Epac2, tiene una afinidad reducida por el AMPc, y su función no es clara (B). También posee un dominio DEP que se encarga de la localización en la membrana. La región catalítica está compuesta por una región con homología al dominio CDC25 (CDC25-HD). El dominio CDC25-HD es el dominio catalítico, y es suficiente para catalizar el intercambio de nucleótidos en los miembros de la familia Ras. Hay un dominio de intercambio de Ras (REM), y un dominio de asociación con Ras (RA). El panel C indica un esquema del funcionamiento de la proteína EPAC. (Rehmann et al., 2007).

1.2.5 Canales regulados por nucleótidos cíclicos (Canales CNG).

Los canales CNG son canales catiónicos que se caracterizaron en los fotorreceptores y en neuronas olfativas de los vertebrados. Estos canales forman homo- o hetero-tetrámeros (Figura 1-7). En el lado intracelular, se encuentran los dominios que regulan la apertura de los canales, el *C-linker* y el dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD). La unión de nucleótidos cíclicos al CNBD induce un cambio de conformación en el *C-linker* que permite pasar cationes a través de este canal. Por medio del control del flujo de iones a través de la membrana, estos canales desempeñan un papel crítico en la regulación del potencial de membrana y la concentración de iones intracelular como el Ca^{2+} (Berrera et al., 2008). En general, el GMPc funciona como un ligando más potente que el AMPc para los canales CNG aunque el AMPc es el ligando fisiológico para el canal CNG en las neuronas olfativas.

1.2.6 Canales regulados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos (Canales HCN).

Existe otra familia de canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos, los canales HCN, conocidos como “canales marcapasos”. Los canales HCN son activados a voltajes hiperpolarizantes y su sensibilidad al voltaje se modifica por la presencia de nucleótidos cíclicos. Para los canales HCN, el AMPc es un segundo mensajero más eficiente que el GMPc. De hecho, se sabe que el SpHCN, el primer canal HCN clonado del erizo de mar, (Gauss et al., 1998) es arriba de 1000 veces más sensible al AMPc que al GMPc (Kaupp and Seifert, 2001).

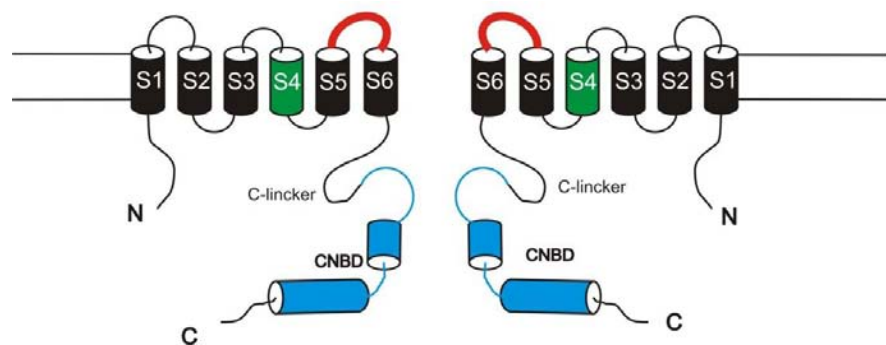


Figura 1-7. Estructura de canales CNG y HCN. Un ejemplo de los canales modulados por nucleótidos cíclicos son los canales HCN. Los canales HCN poseen seis segmentos transmembranales, y un dominio de CNBD (azul). En presencia de un nucleótido cíclico cambia su sensibilidad al voltaje para lograr su apertura. En este esquema en verde está marcado el dominio sensor de voltaje, la región resaltada en rojo muestra la región del poro.

1.3 El dominio de unión a nucleótido cíclico (CNBD).

Como se mencionó anteriormente, existen dos dominios conservados que interactúan con los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc). Uno es el dominio GAF que se encuentra en las fosfodiesterasas. Otro es el CNBD que se encuentra en proteínas PKA, EPAC, canal CNG y canal HCN (Figura 1-8). Ambos dominios, cuando se unen los nucleótidos cíclicos a los dominios, las proteínas alteran su estructura tridimensional funcionando como reguladores (*switch* molecular) de la actividad de esas mismas proteínas.

Estudios cristalográficos revelaron que el CNBD está formado por β sandwich (β 1-8) como el cuerpo principal, por α hélices en N- y C-terminales. El β sandwich posee un *cassette* de unión a fosfatos denominado PBC (por las siglas en inglés “Phosphate-Binding Cassette”). Este PBC se une al fosfato del nucleótido cíclico y tiene amino ácidos conservados en todos los CNBDs. En el C-terminal del β sandwich, se encuentra una α hélice llamada bisagra, que contiene un residuo de fenilalanina o tirosina. La bisagra es una estructura conservada en todos los CNBDs con varios tamaños. Seguida de la bisagra se encuentra la tapa, la cual varía mucho en estructura y secuencia entre un CNBD y otro (Figura 1-8). En el caso de la PKA y el canal HCN, la tapa se forma por una α hélice, mientras que en la proteína EPAC está formada por laminas β . La tapa interactúa con la base nitrogenada del nucleótido cíclico y determina la selectividad al AMPc o al GMPc de cada CNBD (Rehmann et al., 2007).

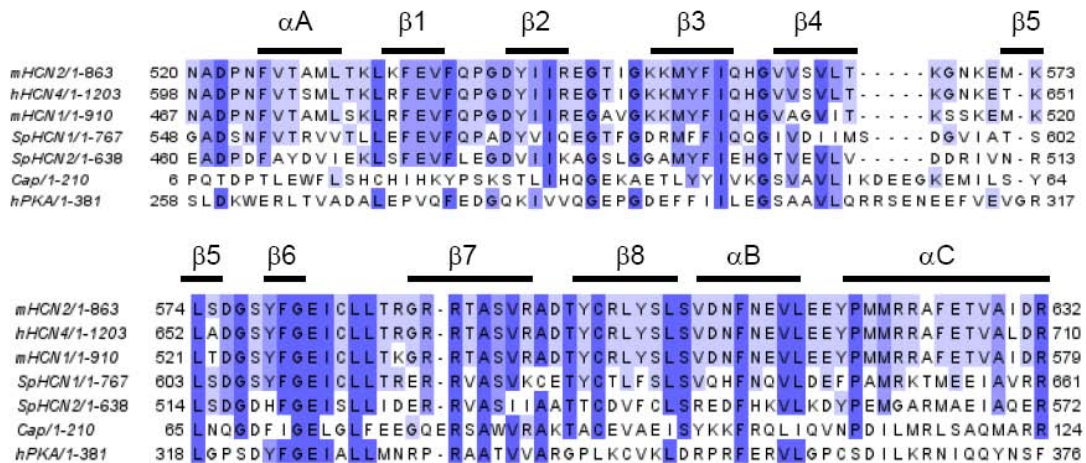


Figura1-8. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de varios CNBDs. Se muestra el porcentaje de identidad entre las secuencias, el color más intenso muestra un mayor porcentaje de identidad y el color más claro, un menor porcentaje de identidad. Las barras negras representan las regiones predichas para las α hélices y láminas β modificado de Kaupp and Seifert, 2001.

La selectividad y afinidad del CNBD a los nucleótidos cíclicos son de gran importancia para controlar la función de la proteína. En el caso de la proteína EPAC, su CNBD une AMPc con una K_d de 1-5 μM , mientras que la EC_{50} (la concentración de la activación media máxima) es de 40 μM en el caso de los canales CNGs y 0.7 μM para el canal spHCN (Kaupp and Seifert, 2001). La PKA posee la EC_{50} de aproximadamente 1 μM (Bos, 2003).

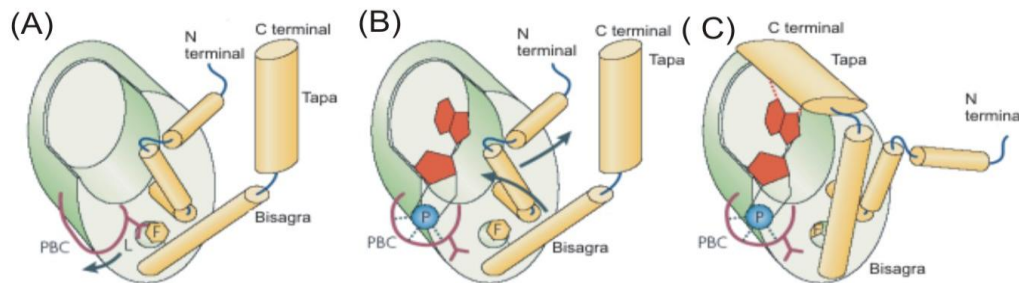


Figura 1-9. La estructura general del CNBD y un modelo de los cambios conformacionales. Este dominio se encuentra altamente conservado en la mayoría de las proteínas que se unen a nucleótidos cíclicos, el *cassete* PBC al unirse al grupo fosfato (azul) de un nucleótido cíclico induce un cambio conformacional permitiendo que la bisagra y la tapa interactúen con la base nitrogenada (línea punteada rojo). Modificado de Rehmman et al., 2007

1.4 Importancia del AMPc en la función del espermatozoide.

La fecundación es un proceso fundamental en la reproducción sexual y en la generación de un nuevo individuo. Para que se lleve a cabo este evento, se necesita la interacción de dos células sexuales; el óvulo y el espermatozoide.

El espermatozoide es el gameto masculino, cuyo papel principal es llevar la información genética al óvulo. En la mayoría de los animales, el espermatozoide está formado por la cabeza y el flagelo. En la cabeza se encuentra el núcleo, en donde se almacena la información genética, y el acrosoma, que es una vesícula derivada del aparato de Golgi, que se localiza en la porción anterior del núcleo. Este organelo contiene enzimas hidrolíticas que facilitan la penetración del ovulo a través de la capa externa del óvulo.

En mamíferos, el flagelo se divide en tres secciones: la pieza media, en la cual se encuentra la vaina mitocondrial, la pieza principal, rodeada por la vaina fibrosa, y la pieza terminal que no posee estructuras accesorias (Figura 1-10). En todo el flagelo se

encuentra el axonema, la estructura que confiere movilidad al espermatozoide. El espermatozoide es una célula morfológicamente y funcionalmente muy polarizada. Se sabe que las proteínas que participan en la señalización celular están localizadas en algunos sitios específicos. Por ejemplo, AKAP3 y AKAP4 (componentes de la vaina fibrosa) se encuentran solamente en la pieza principal del flagelo.

Para poder interactuar con el óvulo el espermatozoide requiere de varios pasos procesos de maduración como cambios en su patrón de movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal. Estos pasos de maduración dependen de la señalización celular a través de los segundos mensajeros mencionados anteriormente. Dentro de ellos, el AMPc es de crucial importancia en el espermatozoide.

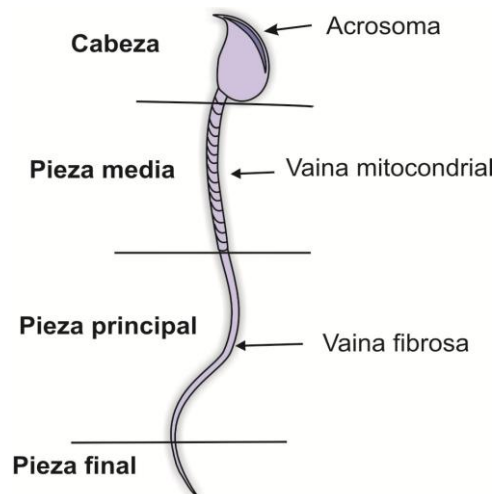


Figura 1-10. Representación esquemática de la estructura del espermatozoide de ratón y sus estructuras características.

1.4.1 La regulación de la movilidad en el espermatozoide.

En general, los espermatozoides no tienen la capacidad de moverse dentro del testículo; la adquieren en su tránsito por el epidídimo (Morisawa, 1994). En varias especies se requiere de la fosforilación de proteínas del axonema para iniciar la movilidad, por ejemplo: la fosforilación de la dineína ATPasa por la PKA. El ratón macho que carece de la adenilato ciclasa soluble es infértil debido a que sus espermatozoides tienen defectos en la movilidad (Esposito et al., 2004; Hess et al., 2005). Sin embargo, dichos espermatozoides pueden recuperar el movimiento parcialmente cuando se tratan con un análogo de AMPc permeable a la membrana plasmática (Esposito et al., 2004)

1.4.2 La Capacitación.

La capacitación es un proceso de maduración del espermatozoide que ocurre en el tracto genital femenino para adquirir la capacidad de fecundar al óvulo. A pesar de que se han realizado estudios intensivos, todavía no se sabe bien el mecanismo molecular que ocurre durante la capacitación. Durante la capacitación ocurre un incremento en el pH intracelular (pH_i), en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), una modificación de lípidos de membrana y el incremento de la fosforilación de proteínas (tanto serina y treonina como tirosina).

El bicarbonato (HCO_3^-), la albúmina (BSA) y el Ca^{2+} son factores extracelulares indispensables para la capacitación. El HCO_3^- es importante debido a que activa directamente a la sAC (Chen et al., 2000). Apoyando esta idea, se reportó que, en los espermatozoide de ratón nulo a la ACs, no se incrementa el nivel de fosforilación en tirosinas durante la capacitación (Hess et al., 2005). Por otro lado, los espermatozoides de ratón transgénico que carecen de la fosfodiesterasa (PDE) 11, presentan capacitación prematura (Wayman et al., 2005). Estos datos indican claramente la importancia de la regulación precisa del nivel del AMPc en el proceso de la capacitación.

1.4.3 La reacción acrosomal (RA).

La RA es la exocitosis del acrosoma. En este caso particular, ocurre la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en múltiples sitios y se liberan vesículas híbridas formadas por las dos membranas. Esta fusión permite la liberación de enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma y facilita la penetración de las capas externas del óvulo. El espermatozoide puede fusionarse con el óvulo solamente después de la RA. Por lo cual, la RA es quizá la respuesta celular más importante e indispensable para el proceso de la fecundación (Langman 1981).

Datos recientes sugieren que el AMPc juega un papel importante en la RA activando dos distintas vías de señalización. La PKA es la proteína blanco del AMPc más estudiada y se ha demostrado que esta enzima está involucrada en la RA en animales como el erizo de mar (Su et al., 2005). Sin embargo, su participación en la RA de los mamíferos no es muy clara. Recientemente, en el espermatozoide humano se identificó EPAC como otro blanco importante del AMPc. Un análogo de AMPc que activa selectivamente a EPAC, 2-OMetil-AMPc, induce la RA en el espermatozoide de humano (Branham et al., 2006), lo cual sugiere que EPAC participa en la RA.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Los métodos para medir la concentración de AMPc.

Tradicionalmente, la determinación del nivel de AMPc en las células se realiza por medio de un inmunoensayo. El principio general de esta técnica es la competencia con un anticuerpo anti-AMPc entre el AMPc en la muestra y el AMPc marcado por radioisótopos o enzimas. Aunque este tipo de ensayo es muy sensible, tiene limitaciones debido a que requiere tratamientos para fijar (y romper) la célula y extraer el segundo mensajero de la muestra. Así, se pierde cualquier información espacial de la molécula en la célula. Además, la determinación de AMPc por inmunoensayo tiene una resolución temporal baja, del orden de minutos (Williams 2004).

2.2 Métodos para medir cambios espacio-temporales del AMPc en células.

Una de las soluciones para mejorar la resolución temporal es la detección de AMPc en tiempo real a través de canales CNG. En este sistema, se determina la concentración de AMPc por la entrada de Ca^{2+} (y Na^+), la cual se puede determinar con un colorante fluorescente como Fura-2 (figura 2.1 A), o por medio de registros electrofisiológicos. La desventaja de esta técnica es que los canales CNG no distinguen ~~muy bien al~~ específicamente entre el AMPc del GMPc aunque se han hecho mutaciones en la proteína para mejorar este aspecto. Otra desventaja es que registra los cambios del AMPc solamente cerca de la membrana plasmática (Barrera et al., 2008).

2.3 Indicador de AMPc fluorescente tipo FRET.

Otra manera de explorar la presencia de nucleótidos cíclicos en una célula es utilizar sensores fluorescentes. Hasta la fecha, se ha aplicado principalmente la técnica de la FRET (transferencia de energía resonante de Förster) para los sensores. La FRET es un fenómeno de la física cuántica que ocurre entre un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor si están a una distancia menor a 10 nm y el espectro de emisión del donador se sobrepone con el espectro de absorción del aceptor. La eficiencia de la transferencia de energía (E) puede medirse con la siguiente ecuación: $E = 1 / (1 + (R/R_0)^6)$, donde R es la distancia entre los dos fluoróforos, R_0 es la distancia de Förster (la distancia en la cual la transferencia de energía es del 50 %).

En 1991, el grupo del Dr. Roger Tsien desarrolló un sensor de AMPc fluorescente tipo FRET utilizando PKA (Adams et al., 1991). Como se explicó anteriormente, la subunidad catalítica y la regulatoria de la PKA forman un complejo en el estado basal y

se disocian cuando el AMPc se une a la subunidad regulatoria. Utilizando esta característica de la PKA, se marcaron las subunidades de la PKA con dos fluoróforos diferentes que pueden llevar a cabo FRET en el estado basal. El nivel de FRET disminuye cuando se incrementa la concentración del AMPc. Este fue el primer sensor fluorescente para el AMPc y nos permite determinar la dinámica espaciotemporal del AMPc en la célula. Sin embargo, la aplicación de este sensor requiere la técnica de microinyección para introducirlo a una célula, y esto no se puede realizar en células pequeñas como el espermatozoide.

En el 2000, Zaccoo y sus colaboradores desarrollaron un sensor de AMPc utilizando dos isoformas de la proteína verde fluorescente (GFP) para marcar a la PKA en lugar de la modificación química, lo que originó un sensor codificado genéticamente. (Zaccoo et al., 2000). (Figura 2.1 B). Los sensores codificados genéticamente tienen la ventaja de expresarse en células específicas por transfección de un plásmido con un promotor específico y también se puede dirigir una localización específica dentro de la célula por agregación de un péptido señal particular.

El sensor de AMPc que usa los dominios de la PKA es de FRET intermolecular, es decir, los dos fluoróforos se separan cuando el AMPc se une al dominio regulatorio. Por lo anterior, FRET intermolecular tiene una desventaja en la reversibilidad; hay retraso para formar el complejo de dominios después de separar dos dominios. Además, proteínas endógenas de la PKA siempre pueden interrumpir la formación del complejo de los dominios marcados por fluoróforos.

Para evitar el problema de FRET intermolecular, en el 2004, se desarrolló un nuevo sensor para AMPc mediante el uso de FRET intramolecular, es decir los dos fluoróforos se encuentran dentro de un mismo polipéptido. Tres grupos han desarrollado independientemente nuevos sensores de AMPc basados en EPAC (figura 2-1 C) (DiPilato et al., 2004; Nikolaev et al., 2004; Ponsioen et al., 2004). En el 2003 se reportó, por primera vez, la cristalografía del CNBD en ausencia de nucleótido cíclico usando el dominio de EPAC2 (Rehmann et al., 2006). Antes de este artículo, había información de cristalografías de CNBDs de varias proteínas, pero todos eran complejos con un nucleótido cíclico asociado. El nuevo reporte reveló el cambio importante de la estructura del dominio CNBD entre el estado libre y del unido al nucleótido cíclico. Usando esta información, se construyó un polipéptido con el CNBD del EPAC y dos isoformas de GFP (CFP y YFP) (Figura 2.1 C). El grupo del Dr. Lohse desarrolló el sensor más compacto y exitoso, llamado EPAC-camps. Los EPAC-camps son mejores que los

sensores de AMPc anteriores ya que están compuestos por un polipéptido (FRET intramolecular) y tienen una respuesta rápida. Utilizando EPAC-camps, en las células beta, se observó la oscilación del AMPc junto con la oscilación del $[Ca^{2+}]$ inducida por un ligando (Landa et al., 2005).

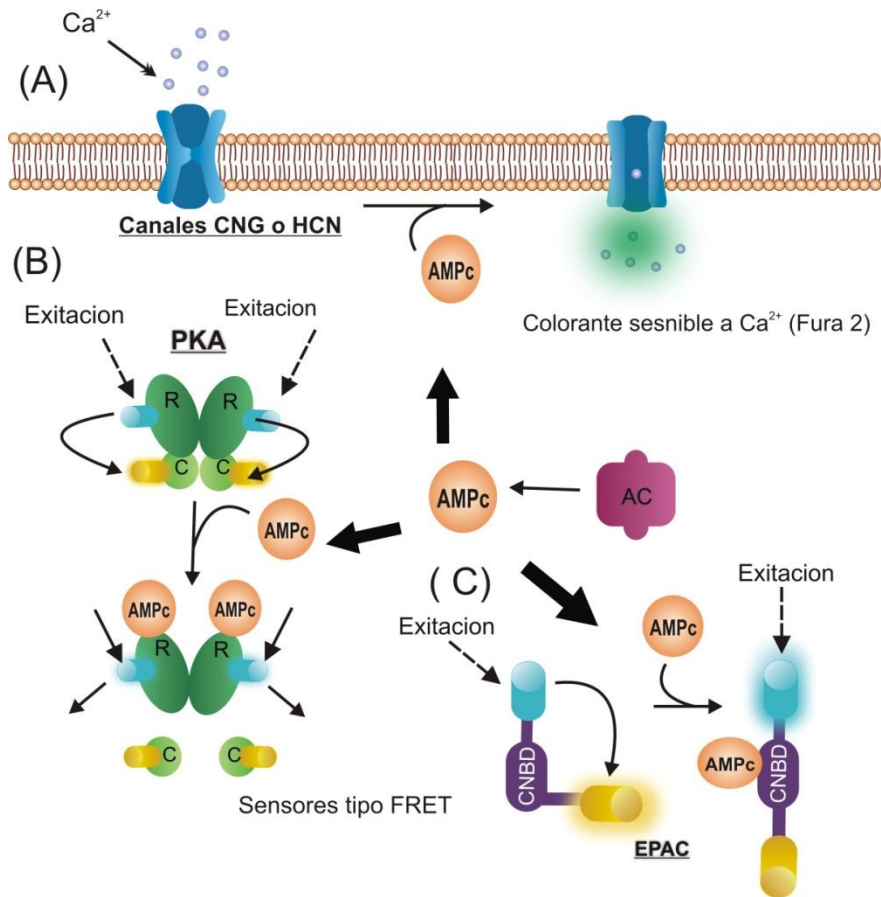


Figura 2-1. Tipos de sensores para el AMPc desarrollados hasta la fecha, en A muestra el sensor del AMPc utilizando un canal tipo CNG, el cual al encontrarse con AMPc se abre y deja pasar Ca^{2+} , que activa a un colorante fluorescente (Fura-2). En el panel B se observa un sensor FRET intermolecular basado en PKA, en donde se muestra a la subunidad reguladora (R) y la subunidad catalítica (C) marcadas con las proteínas Cian y amarillas. En C muestra un sensor intramolecular para el AMPc como EPAC-camps, en el cual dos proteínas fluorescentes están en un mismo polipéptido.

A pesar de que los sensores FRET son útiles para medir varios parámetros celulares, éstos poseen algunas desventajas como: 1) interferencia del FRET intramolecular (la función de sensor) por FRET intermolecular en caso de que la densidad

de sensor sea demasiado alta, 2) los cambios de la señal fluorescente son pequeños (aproximadamente 50 % aunque existen algunas excepciones), 3) sensibilidad por la modificación (agregación de péptidos en el N o el C terminal de sensor). De hecho, en el laboratorio se presentó un problema relacionado con este punto.

La bióloga Ana Yuridia Ocampo Gutiérrez modificó EPAC-camps con péptidos penetrantes a la membrana (PPMs) para facilitar que el sensor sea permeable a la membrana plasmática. Los PPMs son péptidos ricos en argininas y lisinas (7-20 aa) que promueven la penetración de la proteína desde el lado extracelular del citoplasma aunque no se conoce la causa de este mecanismo molecular. Ocampo modificó el amino terminal de EPAC-camps con 5 diferentes PPMs y todas las modificaciones afectaron la función del sensor. Además, la inserción de 6 histidinas en el carboxilo terminal también suprimió la función del sensor. Estos resultados indican que EPAC-camps es muy sensible a las modificaciones, probablemente porque los extremos terminales de la proteína están cerca del dominio de unión nucleótido cíclicos y las modificaciones afectan la interacción del AMPc con el dominio y/o impiden su cambio conformacional del dominio.

2.4 Sensores fluorescentes basados en una sola GFP.

2.4.1 La proteína verde fluorescente (GFP).

La GFP es una proteína obtenida de la medusa, *Aequorea victoria*, y forma un fluoróforo espontáneamente. La GFP es muy utilizada en biología molecular y biología celular como reportero transcripcional, marcador de proteínas, biosensor, o como fluoróforo donador y aceptor en FRET (Tsien, 1998).

La GFP posee un fluoróforo rodeado por 11 láminas β (Figura 2-2), las cuales favorecen su gran estabilidad. Una característica muy importante de la GFP es que se forma un fluoróforo espontáneamente de tres aminoácidos, serina (o treonina)-tirosina-glicina, sin necesidad de ningún cofactor o enzima (Tsien, 1998), lo que le permite expresarse en cualquier tipo celular en condiciones aeróbicas.

La GFP silvestre no se pliega adecuadamente a 37°C y su fluoróforo presenta dos picos de excitación (400 nm y 475 nm) debido a dos estados de protonación en el grupo fenol del fluoróforo (Figura 2-2 A) (Tsien, 1998). Para mejorar estas propiedades, se han desarrollado varias isoformas que muestran el plegamiento rápido y estable a 37° C y solo un pico de excitación (EGFP: 490 nm, Sapphire: 400 nm) (Figura 2-3 B y C). Otros cambios que se han realizado son variedad de colores en isoformas de la GFP por

mutación del barril β (sustitución de la treonina 203 por tirosina para YFP “Yellow Fluorescence Protein”) o sustitución de tirosina por otro aminoácido aromático en el fluoróforo (triptófano para CFP “Cyan Fluorescence Protein” e histidina para BFP “Blue Fluorescence Protein”) (Figuras 2-3 D,E,F). Además, el descubrimiento de nuevas proteínas fluorescentes en otros organismos, como en varios tipos de corales, extendieron la variedad de colores particularmente hacia el rojo (Day and Davidson, 2009).

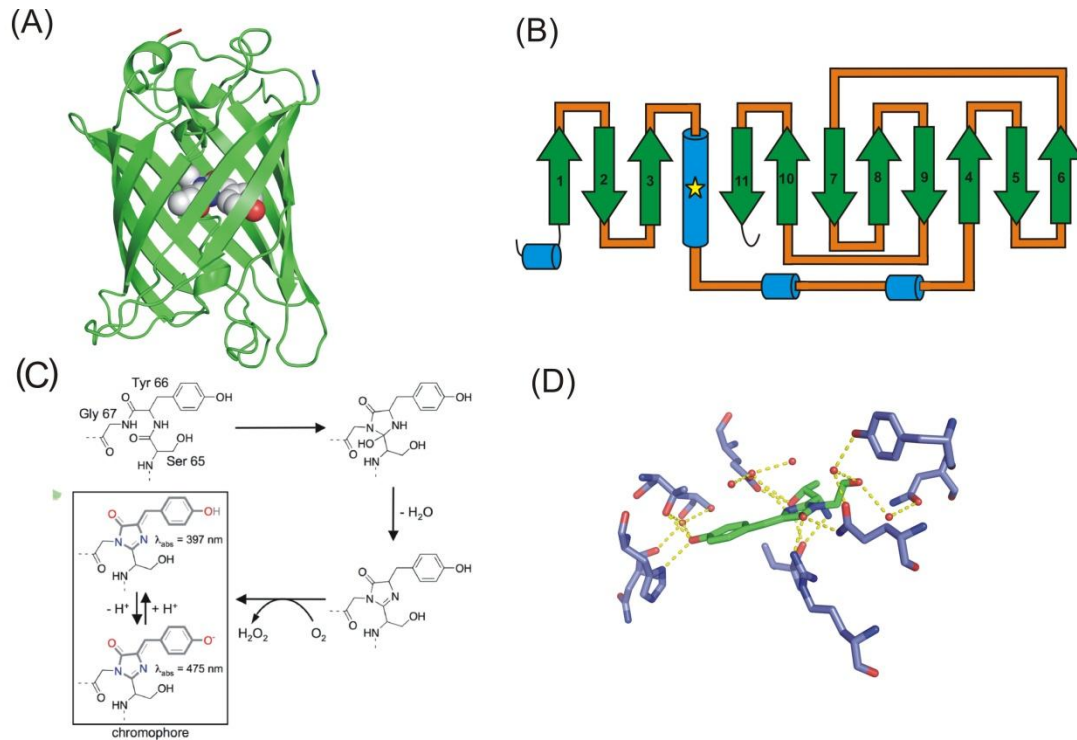


Figura 2-2. Estructura de GFP. El panel **A** muestra la estructura cristalográfica de la GFP (PDB 1EMA). Once barriles β rodean el fluoróforo (esferas). **B** muestra la estructura secundaria de esta proteína, en verde se marcan las láminas β y en azul las α hélices, la estrella marca la posición aproximada del fluoróforo. En **C** se muestra el mecanismo propuesto de la formación del fluoróforo, modificado de Day and Davidson, 2009. En **D** se muestra el fluoróforo y su interacción con diferentes aminoácidos del barril β .

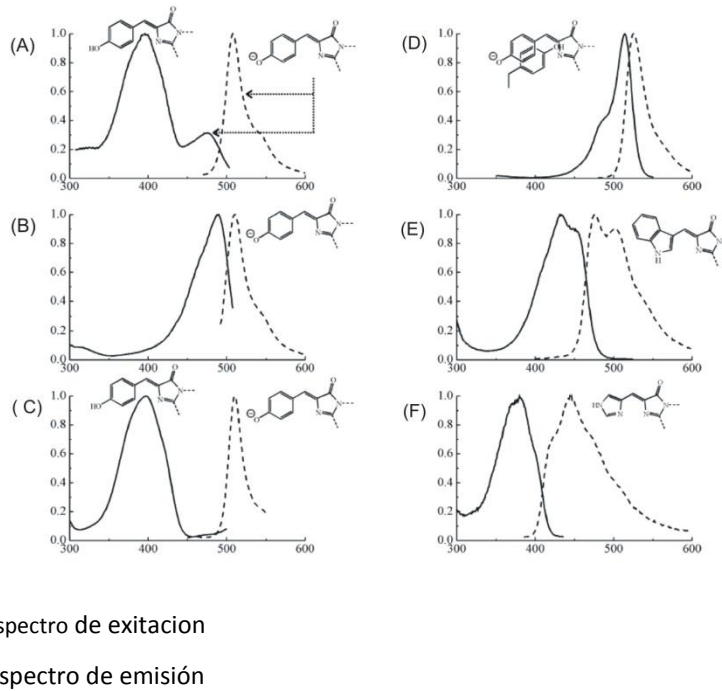


Figura 2-3. Estructura de fluoróforos de proteínas fluorescentes y sus espectros de fluorescencia. En todas las figuras, la línea continua indica espectro de excitación y la línea punteada indica espectro de emisión. El panel **A** muestra el fluoróforo de GFP silvestre. El grupo fenol existe en un equilibrio de dos estados de protonación, lo cual explica los dos picos de excitación. En el estado excitado (en el rango de pico segundos), el grupo fenol suelta un protón y se convierte en la forma ionizada, lo que explica la presencia de un solo pico de emisión. En **B** y **C** se muestran los espectros y la forma del fluoróforo de EGFP y Sapphire, respectivamente. En **D** se muestran los espectros y un complejo del fluoróforo de EYFP. La tirosina 203 incrementa la conjugación electrónica π , la cual desplaza picos de excitación y emisión hacia longitud de onda más larga. En **E** y **F** se muestran los espectros y el fluoróforo de CFP y BFP, respectivamente. En el eje de las X se muestra la longitud de onda en nm, en el eje Y se muestra la intensidad de fluorescencia normalizada. Figuras modificadas de (Tsien, 1998).

La GFP es muy resistente a la fusión de las proteínas en su N y C terminal, por lo que es empleada para fusionarla a otras proteínas y así, usarla como marcador de expresión y de su localización intracelular de estas

en la célula. Además de su uso pasivo, la GFP se ha utilizado extensivamente en sensores fluorescentes codificados genéticamente. Como ya se mencionó, uno de sus usos principales está en los sensores tipo FRET, que aprovechan el aumento en la paleta de colores de las proteínas fluorescentes (FP). Otro uso es en los sensores basados en FP individuales; un ejemplo es el empleo de la GFP silvestre, cuya fluorescencia es

sensible a cambios en el pH, y otro es la de la isoforma amarilla (YFP), cuya fluorescencia es sensible a Cl⁻ (Lakowicz, 1999; Lakowicz, 2006).

Por otro lado, la GFP parece ser susceptible a la inserción de un péptido o una proteína en su barril β , es decir, la estructura y la función (la propiedad de fluorescencia) de la GFP se alteran por una inserción. Sin embargo, existen algunos sitios que permiten inserciones de un péptido con una pérdida mínima de función (Abedi et al., 1998). Relacionado a este descubrimiento, el primer sensor fluorescente para Ca²⁺ con una sola GFP sin usar FRET fue desarrollado por el grupo de Dr. Tsien, insertando calmodulina dentro del barril β (posición 145) de la GFP (Baird G., et al 1999). Se nombró a este sensor “camgaroo” (Figura 2-4 D). En el mismo trabajo se reportó que la GFP mantenía su fluorescencia a pesar de haber sido permutada circularmente (cpFP), esto es, que se unan los extremos N y C terminal originales de la proteína y se formen unos nuevos extremos N y C terminales (Figura 2-4 A y C).

La estrategia para crear un sensor basado en FP que detecta cambios externos es la inserción de un dominio que conlleve un cambio conformacional en respuesta a la unión de un ligando de interés. La unión del ligando es comunicada a la FP a través de una distorsión local en la estructura. La distorsión puede incrementar o disminuir la fluorescencia debido a un cambio en la interacción entre el fluoróforo y moléculas que lo rodean. En consecuencia, se puede alterar el coeficiente de extinción molar (eficiencia de excitación) y/o la eficiencia cuántica del fluoróforo. En el caso particular de la GFP y YFP, que contienen un grupo de fenol, el equilibrio entre las formas protonada y desprotonada (forma ionizada) del fluoróforo altera el espectro de excitación redistribuyendo picos de excitaciones entre 400 nm y 500 nm (Frommer et al., 2009)

Cuando los nuevos N y C terminal estén cerca del fluoróforo en una proteína fluorescente con permutación circular 145-148 (cp145FP-cp148FP), el fluoróforo se queda expuesto al medio y se vuelve más sensible a cambios en su entorno. A partir de esta idea se han desarrollado varios tipos de sensores para diversos metabolitos y parámetros celulares como: calcio (Baird et al., 1999; Nagai et al., 2001; Nakai et al., 2001; Souslova et al., 2007) potencial redox (Belousov et al., 2006), voltaje (Ataka and Pieribone, 2002; Guerrero et al., 2002), la razón ATP/ADP (Berg et al., 2009), GMPc (Nausch et al., 2008) Ins(1,3,4,5)P₄, (Sakaguchi et al., 2009)

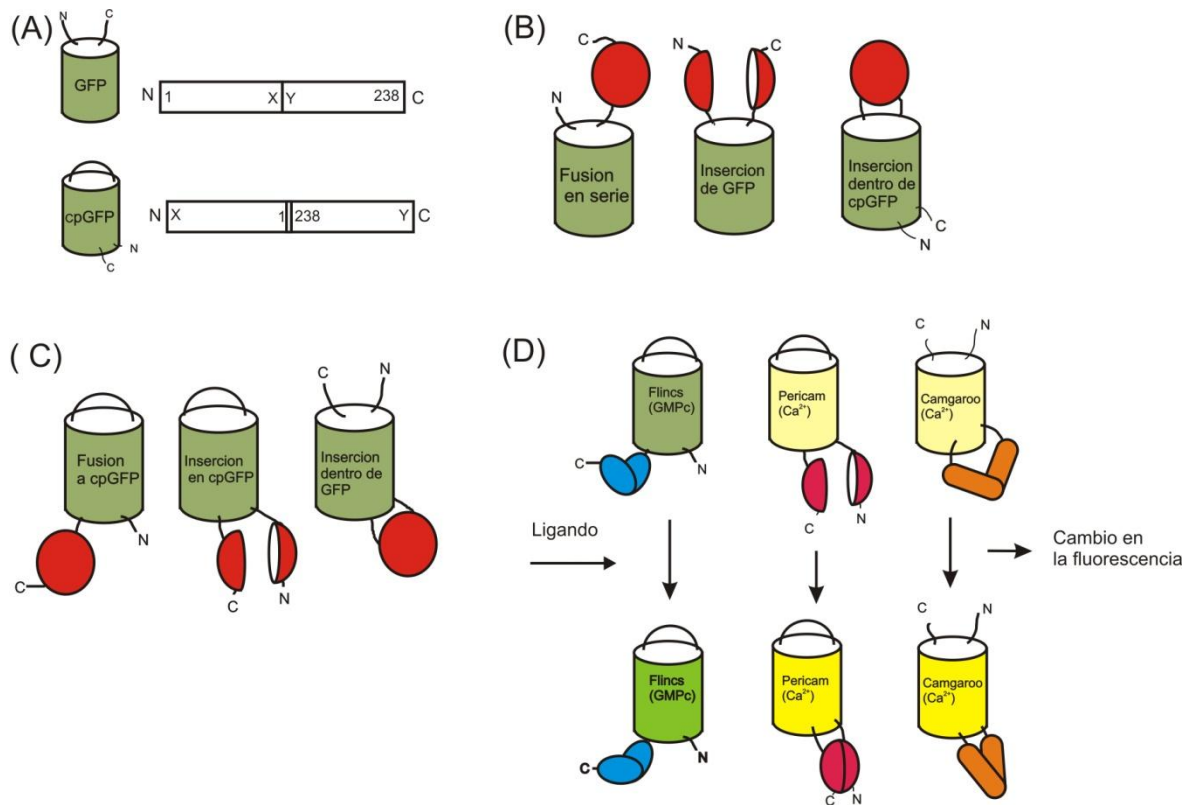


Figura 2-4. Permutación circular de GFP (cpGFP) y sensores derivados de cpGFP.

A muestra la estructura de GFP y permutación circular de GFP (cpGFP). En cpGFP, los N y C terminales originales están unidos a través de un "linker" y se generan unos nuevos N y C terminales. B muestra los casos de que agregación o inserción de proteína(s) no afectan la propiedad de la fluorescencia de GFP o cpGFP. C muestra los casos de que las modificaciones afectan la propiedad de la fluorescencia de GFP o cpGFP. D muestra algunos ejemplos de sensores basados en una FP son: Flincs que detecta GMPc (Nausch et al., 2008), pericam que detecta Ca²⁺ (Nagai et al., 2001), camgaroo que también detecta Ca²⁺ (D). Modificado de (Baird et al., 1999).

2.4.2 Sensores fluorescentes para nucleótidos cíclicos basados en cpFP.

Recientemente se logró desarrollar un sensor fluorescente para GMPc basado en cpFP llamado FincG (Nausch et al., 2008) uniendo una parte de la PKG I, que contiene dos CNBDs, al N terminal de la cpGFP (Figura 6D). El CNBD sufre un cambio conformacional en presencia de su ligando (en este caso GMPc) y afecta la fluorescencia de la FP con lo que se pueden detectar cambios en la concentración del GMPc en una célula. El cambio de la fluorescencia en presencia de GMPc es de aproximadamente el doble que en ausencia de GMPc (Nausch et al., 2008). Las ventajas generales del sensor basado en cpFP son:

- 1) Más compacto que el tipo FRET, permite que pasen a través de poro del núcleo celular (Nagai et al., 2001).
- 2) El cambio de señal fluorescente podría ser más grande (> 100 %) que los sensores de FRET (aproximadamente 50 %).
- 3) a diferencia de FRET, no hay interferencia de la fluorescencia en caso de sobreexpresión del sensor.
- 4) ya que las FPs sola es mas estable, se esperaría menos efectos negativos a la función del sensor por una modificación de este.

En el caso del AMPc aún no hay un sensor con estas características. Para el diseño de un sensor de este tipo se necesita de un CNBD que sea altamente específico para el AMPc. Por esta razón, el objetivo principal de este proyecto es crear un sensor fluorescente para AMPc como FincG. Decidimos utilizar una permutación circular de una variante de la YFP llamada Venus (cp Venus); unido al CNBD del canal de erizo de mar SpHCN2 en el amino terminal. Se escogió el dominio de esta proteína debido a que se sabe que SpHCN1, el primer canal HCN clonado en esta familia, es 10000 veces más sensible al AMPc que al GMPc (Kaupp and Seifert, 2001).

3. HIPÓTESIS.

Las proteínas quiméricas formadas por el dominio de unión al AMPc y las permutaciones circulares de una proteína fluorescente (cpFPs) se convierten en un sensor fluorescente para AMPc y se pueden aplicar para medir el nivel de AMPc en el espermatozoide.

4. OBJETIVOS.

Construir varias proteínas quiméricas usando el dominio de unión al AMPc de un canal regulado por el AMPc del erizo de mar (spHCN2) y una proteína fluorescente con permutación circular (cpFPs) y caracterizar la propiedad de espectro de absorción y espectro de fluorescencia.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Construir 6 plásmidos que codifiquen proteínas quiméricas con el CNBD del SpHCN2 y con las cpFPs en un vector de expresión de proteínas (pRSET) en bacterias.
- 2) Expresar las proteínas quiméricas en bacterias y caracterizar las propiedades de espectro de absorción y espectro de fluorescencia en ausencia y presencia del AMPc.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Material.

- Medio LB líquido: 25 gr de LURIA BROTH, SIGMA, disuelto en 1 litro de agua destilada y se esteriliza por autoclave
- Medio LB sólido: 15gr de Bact™ Agar, BD₇, disuelto en 1 litro de medio LB líquido y esterilizado en autoclave.
- TAE (para electroforesis de gel de agarosa): 2 mM EDTA, 40 mM Tris-Acetato pH 8.5
- Solución de CaCl₂ (para células competente): 60 mM CaCl₂, 15 % de glicerol PIPES 10mM pH ...
- Enzimas: *NheI*, *BamHI*, *HindIII* (Fermentas), la ligasa del fago T4 (Invitrogen), DNA polimerasa Vent (BioLabs)
- Colorantes de DNA Sybr safe, Gelstar, Sybr gold (Invitrogen)
- 8- [Pharos-575]- adenosina- 3', 5'- monofosfato ciclico (8-[φ-575]-cAMP) (BioLog)
- “Buffer” de carga de proteínas 5X: 10% SDS, 50% glicerol, 8 mM EDTA, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 5% β-mercaptoetanol, 1.5 mM de azul de bromofenol.
- Soluciones para gel de poliacrilamida SDS -PAGE
- “Buffer” pH 8.8 para gel separador (1.5 M Tris-HCl, 8 mM Na₂EDTA, 0.4% SDS)
- “Buffer” pH 6.8 para gel condensador (0.5 M Tris-HCl, 5 mM Na₂EDTA, 0.4% SDS)
- Solución de acrilamida (Acrilamida 30%, Bis-acrilamida 0.8%)
- Solución para teñir (0.5% azul de Coomassie, 50% metanol, 5% ácido acético)
- Solución para desteñir (20% metanol, 7.5 % ácido acético).
- Plásmido: pRSET (Invitrogen) con el gen que codifica la proteína Venus monomérica (mVenus).

Equipo.

Para las mediciones de fluorescencia se usó el Fluorómetro (SLM 8000 modificado por Olis). Se empleó el espectrofotómetro marca HP modelo 8452A para la medición de la absorbancia tanto de las células bacterianas como de las proteínas fluorescentes.

Al momento de centrifugar se ocupó: una centrifuga de mesa marca eppendorf, modelo 5415C, una centrifuga refrigerante marca eppendorf, modelo 5403, y una ultracentrifuga marca Beckman modelo Optima

El Termociclador marca eppendorf, modelo mastercycler gradient se utilizó para realizar la técnica de PCR

También se utilizó una campana de flujo laminar para cultivar colonias bacterianas en condiciones asépticas

Material Biológico.

Cepas de *E. coli* para clonación de plásmido DH5 α

Cepas de *E. coli* para expresión de proteínas JM109 (DE3)

5.2 Métodos.

Preparación de células competentes.

Inoculamos colonia única de la cepa de *E. coli* (DH5 α para clonación y JM109 (DE3) para expresión de proteína), en 1 ml de medio LB. Se dejó en un cultivo por ~12 hrs a 37 °C con una agitación moderada (250 rpm). Inoculamos 1 ml de cultivo en 200 ml de medio LB sin antibiótico, se deja en agitación a 250 rpm a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.375-0.4 a 590 nm. Alicuotamos el cultivo en 4 cuatro tubos estériles de polipropileno de 50 ml, y se pusieron en hielo de 5 a 10 minutos. Se centrifugó 7 minutos a 1600 x g, a 4 °C. Descartamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 10 ml de solución de CaCl₂ previamente enfriada. Se centrifugó 5 minutos a 1100 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de solución fría de CaCl₂. Se mantuvo en hielo por 30 min. Se centrifugó 5 min a 1100 x g a 4 °C. Descartamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet en 2 ml de solución fría de CaCl₂. Se hicieron alícuotas de 100 μ l y se guardaron a – 70 °C.

Transformación de bacterias.

A 50 μ m de bacterias competentes en un tubo de 250 μ l, les agregaron 100 ng del plásmido de interés y se colocaron en hielo 20 minutos, después se colocaron en un baño a 42 °C por 2 minutos, y se volvieron a colocar en hielo por 5 minutos, después las pusimos en 1 ml de medio LB sin antibiótico, y se dejan a 37°C y 250 rpm de agitación por una hora. Al final las sembramos en una placa de LB sólido con antibiótico y las dejamos a 37°C toda la noche.

Aislamiento de plásmido.

Se usó el Kit GeneJet plasmid miniprep (Fermentas) de acuerdo al siguiente protocolo: Se inoculó una colonia de bacterias con el plásmido de interés en 1-2 ml de medio LB con una concentración de ampicilina 50 ug/ml, y se dejó a 37°C por 12 horas a 250 rpm de agitación. Se centrifugaron las células a 8,000 rpm en una microcentrifuga de mesa por 2 min. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 250 ul de la solución de resuspensión. Se añadió 250 ul de la solución de lisis y se mezcló invirtiendo de 4-6 veces hasta que la solución se volvió viscosa e incolora. Se añadió 350 ul de la solución de neutralización y se mezcló invirtiendo de 4-6 veces. La muestra se centrifugó a 12000 rpm en una microcentrifuga de mesa por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a una columna GeneJet. Se centrifugó un minuto a 12000 rpm y se descartó la solución que paso a través de la columna. Se hicieron dos lavados con 500 ul de solución de lavado (70% EtOH) y se centrifugó a 12000 rpm. Se hizo una centrifugación adicional para quitar los residuos de la solución de lavado. Para resuspender el plásmido se colocó 50 ul de agua en el centro de la columna, se dejó incubando 2-5 minutos. Se recuperó el agua que contiene el plásmido por centrifugación de 2 minutos a 12000 rpm. Se guardó la muestra a - 20 °C.

PCR.

Para realizar PCR usamos las siguientes concentraciones finales de reactivos: 0.3 uM de oligonucleótidos, "buffer" para PCR con 5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, DNA de interés 1 ng.

Se realizaron 35 ciclos de la siguiente manera: 95 °C 1 min, 55 ° C 1 min, 72 ° C 1 min 30 seg. Posteriormente para terminar la reacción se dejó 2 min a 72° C.

Digestión con enzimas de restricción.

Para insertar el CNBD en los vectores con las cpFP, pusimos a digerir al vector (el plasmido pRSET) y el inserto (el producto del PCR anterior) con las enzimas de restricción NheI y BamHI al mismo tiempo en una doble digestión usando el buffer BamHI (Fermentas). Se digirió 1 µg de DNA con 10 U de BamHI y 20 U de NheI según el protocolo descrito (Manual de Fermentas). Al plásmido obtenido que poseía inserto digirió con las enzimas BamHI y Hind III de la siguiente manera: Utilizamos 10 U (1 ul) de BamHI y 20U (2 ul) de HindIII y se digirieron 1 ug de DNA plásmido cada vez.

Aislamiento de los fragmentos de interés a partir de plásmidos digeridos.

Se corrió el producto de la digestión en un gel de agarosa 1% mezclado con 1x de colorante fluorescente (SYbr safe o Gelstar SYbr Gold). La ventaja de estos colorantes es que se excitan en el rango de la luz azul eliminando los riesgos de trabajar con la luz UV, ya que ésta puede dañar la muestra. Cortamos las bandas para los tamaños esperados. Para el vector con el CNBD el tamaño esperado era de 3.3 Kb, al aislar las FP, estas tiene un tamaño esperado de 800 pb.

Aislamiento del DNA a partir de un gel de agarosa.

Utilizamos el Kit QIAquick (Qiagen). Se corta la banda de interés del gel de agarosa y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se pesó el gel y se añadió 3 veces el volumen del buffer QG por volumen del gel (100 mg/100 µl). Se incubaron las muestras a 50 °C por 10 min o hasta que el gel se disolviera por completo. Añadimos 10 ul de una solución 3 M de acetato de sodio para mantener el pH de la muestra ácido. Añadimos el volumen del gel de isopropanol a la muestra. Colocamos una columna QIAquick en un tubo colector de 2 ml. Se colocó la muestra en una columna QIAquick y se centrifugó por un minuto a 13000 rpm en una microcentrifuga (eppendorf). Descartamos la solución que se deposita en el tubo colector. Se añadió a la columna 0.5 ml del buffer QG y se centrifugo por 1 minuto a 13000 rpm. Para lavar la muestra se añadió 0.75 ml del buffer PE (70% EtOH) a la columna y se centrifuga por 1 min a 10000 rpm. Se realizó una centrifugación adicional para remover completamente el buffer PE de la muestra. Colocamos la columna QIAquick dentro de un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml. Para eluirse, colocamos 50 ul de agua en el centro de la columna y se dejó reposar por 2 minutos, al término de este tiempo se centrifugó por 2 minutos a 13000 rpm.

Ligación.

Para realizar la ligación del vector con la cpFP y el fragmento de la región de interés del CNBD usamos la ligasa del fago T4 según las indicaciones de fabricante en una relación de concentración 1:1 del fragmento a insertar y el vector respectivamente, como control se usó solamente el vector digerido. En los experimentos se utilizó una cantidad de 15 fmol de vector e inserto por igual. Se transformaron bacterias DH5 α y se sembraron en una placa de LB sólido con ampicilina; se observó la cantidad de colonias que crecieron y se comparó con una placa control. Dependiendo del número de células que crecieron en el control se pican de 3 a 5 colonias y se ponen a crecer en medio LB con ampicilina.

Expresión de proteína.

Se transformaron bacterias de la cepa JM109DE3 con las construcciones de interés, las dejamos crecer en 50 ml medio LB a temperatura ambiente 22-26 °C de tres a cuatro días sin IPTG. El vector que utilizamos, pRSET, tiene el promotor de fago T7 y la expresión de T7 RNA polimerasa está regulada por IPTG. Sin embargo, expresión basal de T7 RNA polimerasa es suficiente para expresar proteínas clonadas sin IPTG y la expresión de proteína lenta facilita el plegamiento correcto de muchas proteínas de eucariota.

Purificación de proteína.

Lavamos las células centrifugando el medio con bacterias 3 veces a 1500 x g por 10 min, resuspendiéndolas en medio Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Se añadió a las células resuspendidas inhibidores de proteasas; 0.1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 0.1 mM de benzamidina. Para romper las células se dieron 3 pulsos de sonicación de 50 seg. Después se centrifugaron las células a 50,000 rpm por 20 min, y se recuperó el sobrenadante. Se prepararon 1 ml de columnas de níquel, Ni-NTA Superflow (Quiagen), y se lavaron con 10 ml del medio de purificación 1, posteriormente se añadió el sobrenadante de la centrifugación a la columna. Una vez que la solución con la proteína se pegó a la columna, se añadieron a la columna de níquel 5 ml de medio de purificación 2 con la finalidad de quitar las proteínas inespecíficas, para recuperar la proteína, se añadió 3 ml del medio de purificación 3 y posteriormente se recuperaron tres fracciones, las cuales contenían a la proteína ya pura.

Solución para purificación de proteína:

Solución 1 (300 mM NaCl, 20 mM imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5)

Solución 2 (300 mM NaCl, 50 mM imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5)

Solución 3 (300 mM NaCl, 300 mM imidazol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5)

Cuantificación de proteína.

Cuantificamos la proteína obtenida por el método de Bradford. Para esto se usó un *stock* de albúmina de suero bovino (BSA) con una concentración de 1 mg/ml, a partir de la cual se prepararon varias soluciones con una concentración 2, 4, 6, 8 y 10 mg/ml final de proteína, en cada solución se aforó con agua hasta alcanzar un volumen final de 20 ul, posteriormente agregamos 980 ul de medio Bradford, y medimos la absorbancia de la muestra en un espectrofotómetro a 596 nm, y se graficaron los puntos. Posteriormente para cuantificar la proteína de interés colocamos 2 ul de la muestra y añadimos y aforamos con agua hasta llegar a 20 ul. Después añadimos 980 ul de medio Bradford y medimos su absorbancia en el espectrofotómetro. El valor obtenido se extrapoló con ayuda del programa UV/VIS con la gráfica hecha con las muestras de referencia, y así obtuvimos la concentración final de la proteína.

Medición de la absorbancia y cálculo del coeficiente de extinción molar.

Colocamos una muestra con una concentración conocida de las FP obtenidas en el espectrofotómetro, y medimos la absorbancia de las proteínas entre los 400 y 550 nm. Para calcular el coeficiente de extinción molar usamos la siguiente fórmula:

$$A = \epsilon bc$$

En donde A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1}cm^{-1}$), b es la distancia que recorre la luz en cm en el recipiente que contiene la muestra, que se toma como 1 cm y c es la concentración de la muestra en unidades de mol/L.

Preparación de geles de acrilamida.

Preparamos 4 ml del gel condensador al 4.5 % de acrilamida como sigue: se añadieron 1 ml del buffer de pH 6.8, 0.6 ml de la solución acrilamida-bisacrilamida, 2.5 ul de TEMED, 37.5 ul de APS, y se aforó con agua hasta 4 ml.

Preparamos un gel separador al 10 % de acrilamida total, para preparar 10 ml de gel se utilizaron 2.5 ml de buffer pH 8.8, 3.3 ml de solución de acrilamida-bisacrilamida, 6 ul de tetrametilnediamina (TEMED), 120 ul de APS 10%.

Electroforesis de geles de acrilamida.

Preparamos una solución que tuviera 1 ug de proteína, a la cual se le añadimos el Buffer de carga de proteínas 5X, posteriormente pusimos a hervir la muestra durante 10 minutos. Se corrieron los geles aproximadamente una hora con un voltaje de 100 V. Los geles se revelaron dejándolos una hora en la solución para teñir, luego cambiamos el gel a la solución para desteñir por 30 min. Cambiamos el gel a una solución de desteñir nueva y se dejó una hora más.

Medición de fluorescencia de las FP.

Preparamos las muestras en la solución de purificación 3 y se colocaron en el espectrofluorómetro, se midieron los espectros de excitación (350 - 520 nm con emisión de 530 nm) y emisión (500 - 600 nm con excitación de 485 nm) de las muestras en ausencia y en presencia de 1 mM del AMPc.

Anisotropía.

Para realizar los experimentos de anisotropía se expresaron las construcciones cpFP145 con el CNBD del canal HCN (145 HCN), el sensor tipo FRET EPAC1-camps, la construcción cpFP 145 con el CNBD del EPAC1. Se utilizó el análogo del AMPc; el 8-[ϕ -575]-cAMP para medir el cambio en su anisotropía, se usaron las siguientes condiciones: 8-[ϕ -575]-cAMP sin las proteínas como control, en presencia de las construcciones, y en presencia del AMPc sin marcar. Se utilizó el fluorómetro marca Olis con los respectivos polarizadores. Para calcular la anisotropía se utilizó la siguiente fórmula : (Lakowicz, 1999; Lakowicz, 2006) :

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}$$

En donde r es anisotropía, I_{VV} , es la intensidad de fluorescencia del componente vertical con la luz de excitación vertical, I_{VH} es la intensidad de fluorescencia del componente horizontal con la luz de excitación vertical. G es el cociente de las sensibilidades del sistema de detección (Factor G) para la luz polarizada vertical y la luz polarizada horizontal (Lakowicz, 2006), y se calculó con la siguiente fórmula:

$$G = \frac{I_{VV}}{I_{HV}}$$

De la cual se obtuvo un valor de 0.45 que se utilizó en todos los cálculos posteriores.

Determinación de la eficiencia cuántica (ϕ) de las proteínas.

A partir de la siguiente fórmula:

$$I = \phi \varepsilon c$$

se derivó la fórmula para calcular la ϕ de las cpFP:

$$\phi = \frac{I}{\varepsilon c}$$

Donde I es la intensidad de fluorescencia, ϕ es la eficiencia cuántica de las proteínas, ε es el coeficiente de extinción molar y c la concentración en unidades de mol/L.

La intensidad de fluorescencia fue normalizada respecto a la proteína mVenus,

6. RESULTADOS.

6.1 Diseño del sensor fluorescente para AMPc.

6.1.1 cpVenus.

El principio para crear un sensor basado en FP es que el cambio conformacional de un dominio elegido pueda inducir una distorsión estructural de la FP y generar un cambio en el ambiente del fluoróforo que afecte su propiedad espectral de la fluorescencia. Como ya había mencionado, la PF es estructuralmente muy estable y no es fácil de inducir distorsión estructural por modificación de N- y C-terminal de la proteína original. Sin embargo, algunas FP con permutación circular (cpFP) muestran una desestabilización en su estructura, pero preservan la capacidad de fluorescer. Hasta la fecha, existen varios sensores fluorescentes basados en cpFP (Baird et al., 1999; Berg et al., 2009; Guerrero et al., 2002; Nagai et al., 2001; Nausch et al., 2008; Sakaguchi et al., 2009) y todos utilizaron la posición cerca del aminoácido 145 como el nuevo N-terminal (cp145FP).

Para crear un sensor fluorescente de AMPc conté con la colaboración del Dr. Takeharu Nagai (Univ. Sapporo, Japón), quien desarrolló el sensor fluorescente sensible al calcio utilizando una cpFP llamado pericam (Nagai *et al.*, 2001). El Dr. Nagai me proporcionó 6 diferentes clonas de cpFP(cpVenus), que poseían la secuencia de unión GGSGG entre el N y C terminal originales y con los nuevos N (y C terminales): N-145N (C-144Y), N-146Y (C-145N), N-147N (C-146Y), N-148S (C-147N), N-149H (C-148S) y N-150N (C-149H) (Figura 6-1). La proteína Venus es una isoforma de la YFP, que se plegó más rápido y eficientemente y es insensible al Cl^- (Nagai et al., 2002).

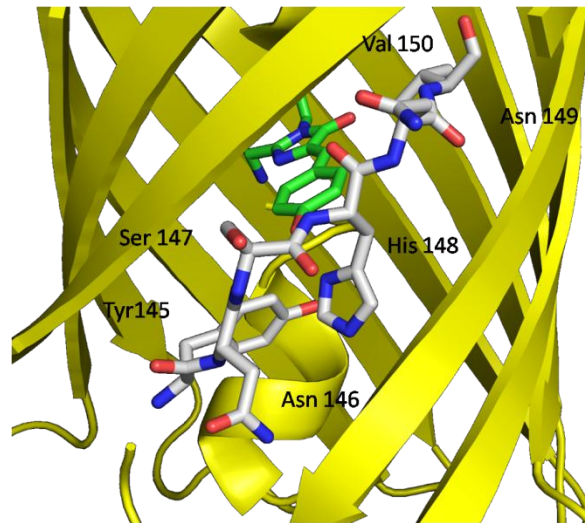


Figura 6-1 Estructura de cpVenus. Se muestran los aminoácidos de los nuevos N-terminales de cpVenus utilizados encima de la estructura de la Venus (PDB 1MYW).

6.1.2 El CNBD del canal SpHCN2.

El dominio de unión a nucleótidos cíclicos (CNBD) que elegí fue el del canal SpHCN2, el cual pertenece a la familia de canales HCN (canales operados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos)(Galindo et al., 2005). Esta familia de canales en vertebrados ha sido asociada la modulación del latido cardiaco, aunque fueron descubiertos originalmente en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Gauss R., et al 98). Estos canales se caracterizan por poseer un dominio sensor de voltaje y un CNBD. Este sitio de unión es muy interesante ya que, en el caso del canal SpHCN1, tiene una selectividad alrededor de 1,000 veces más alta por el AMPc que por GMPc (Kaupp and Seifert, 2001). En nuestro laboratorio, contábamos con una clona del SpHCN2, una isoforma de SpHCN1, que tiene 33% de similitud al SpHCN1, pero 41% de similitud con el CNBD (Figura 1-8 y 6-2) (Galindo B., et al 2005). Por lo anterior, decidimos usar el CNBD de canal SpHCN2 para el diseño de este sensor.

(A)

SpHCN2

```
449 NNFITKVNFLNEADPDFAYDVIEKLSFEVF
    LEGDVIIKAGSLGGAMYFIEHGTVEVLVDD
    RIVNRLSDGDHFGGEISLLIDERRVASIIAATT
    CDVFCLSREDFHKVLKDYPENMGARMAEIA
    QERLNTIDS 578
```

(B)

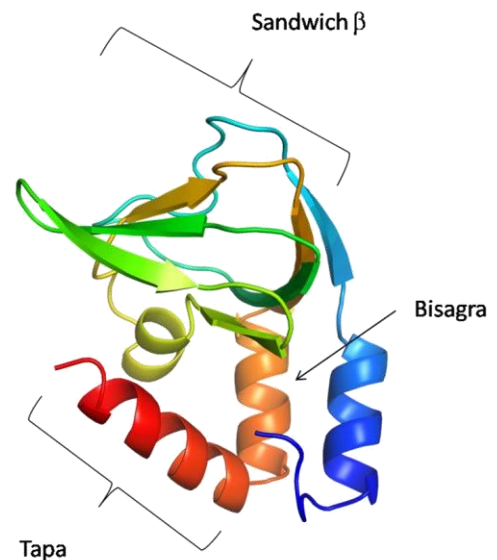


Figura 6-2 Secuencia de aminoácidos y posible estructura del CNBD de SpHCN2. En el panel A se muestra la secuencia usada del canal SpHCN2 para el desarrollo del sensor fluorescente, en B se observa un modelo de la posible estructura del CNBD del canal SpHCN2 y se muestran sus estructuras principales.

6.1.3 Construcción de las proteínas quiméricas.

Las cpVenus están en el vector pRSET, los cuales codifican un extra péptido (de aproximadamente 30 aminoácidos) en el N-terminal el cual consiste en: 6 histidinas (facilita la purificación por columna de Ni^{2+}), "T7 gene 10 leader" (MASMTGGQQM, el producto de atggctagcatgactggtggacagcaaatg, la cual estabiliza el RNA, incrementa el nivel de expresión de una proteína exógena en *E. coli*) y "Xpress Epitope" (DLYDDDDK, es el epítipo de un anticuerpo comercial y el sitio de proteólisis por una proteasa específica) (Figura 6-3). El vector pRSET tiene un sitio de *NheI* justo después de 6 histidinas en el N terminal de la proteína y otro sitio de *BamHI* rio arriba de cpVenus (Figura 6-3). Por lo anterior, se pudo formar una proteína quimérica por inserción del CNBD usando *NheI* y *BamHI* (substitución de "T7 gene 10 leader" y "Xpress Epitope" por el CNBD). La construcción final tiene las 6 histidinas en el amino terminal de la proteína quimérica.

Para el dominio de inserción, elegí el aminoácido del 449 al aminoácido 578 del SpHCN2, el cual incluye el CNBD con dos α hélices en el N terminal y una α hélice que funciona como la tapa de la selectividad al AMPc en el C terminal (Figura 6-2). Diseñé los

oligonucleótidos, Tak30 y Tak31, para amplificar el dominio de inserción con los sitios de restricción para *NheI* y *BamHI* (Fig 6-3 A).

(A)

Tak 30 (*BamHI*): GGT C-GGATCC GAATCGATGGTGTGAGACGTTCTTGGGC
 Tak 31 (*NheI*): ATG G-CTAGC AACAACTTCATAACAAAGGTCAACTTC

M A S N N F I T K V N F L N E A D P D F A Y D
a g a u c t a g c a a c a a c t t c a t a a c a a a g g t c a a c t t c c t c a a c g a g g c t g a c c c c g a c t t c g c t a t g a c

V I E K L S F E V F L E G D V I I K A G
 g t c a t c g a g a a g c t g a g c t t c g a a g t g t t c c t t g a a g g t g a c g t c a t a a a a a g c g g t

S L G G A M Y F I E H G T V E V L V D D
 a g c t t g g g c g g g g c c a t g t a c t t c a t c g a g c a c g g c a c g g t g a a g t a c t c g g g a t g a c

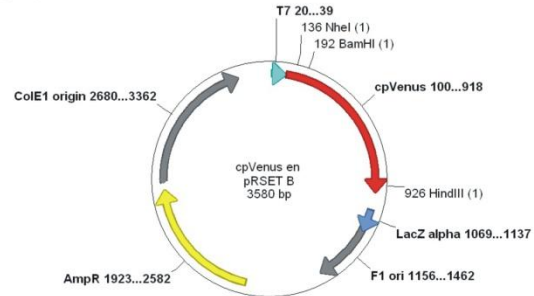
R I V N R L S D G D H F G E I S L L I D
 c g c a t a g t c a a c c g c c t t a g c g a c g g g g a t c a t t t c g g c g a g a t a t c g c t g t t g a t t g a c

E R R V A S I I A A T T C D V F C L S R
 g a a c g c c g a g t c g c a t o c a t c a t c g a a g o c a c g a c g t g t g a t g t a t t c t g t c t c t c t a g a

E D F H K V L K D Y P E M G A R M A E I
 g a a g a c t t c a c a a a g t t t t g a a a a g a t t a c c c c g a g a t g g a g c t c g t a t g g c t g a g a t c

A Q E R L N T I D S D P T
 g o c c a a g a A c g t c t c a a c a c c a t c g a t t c g g a t c c g a c c *BamHI*

(B)



(C)

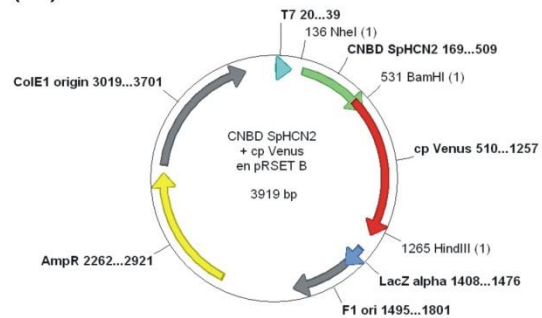


Figura 6-3 Construcción de las proteínas quiméricas. El panel **A** muestra un diagrama de la creación de las construcciones de cpVenus y el CNBD del canal SpHCN2, también se muestra los oligonucleótidos usados para aislar la secuencia de interés del CNBD, se añadieron los sitios para las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI*. En **B** se observa el vector pRSET que posee estos sitios de restricción y ambos, vector y producto de PCR, en **C** el producto de PCR y el vector fueron digeridos con estas enzimas y se ligaron para obtener las diferentes construcciones

6.2 Preparación de los plásmidos que codifican las proteínas quiméricas.

Usando los oligonucleótidos específicos, amplificamos el fragmento correspondiente al CNBD del canal SpHCN2 con los sitios de digestión de *NheI* y *BamHI*. Se digirió al vector y al inserto con las enzimas *NheI* y *BamHI*. Mediante resolución en geles de agarosa con la digestión obtenida, aislamos las bandas correspondientes. Se realizó la ligación de los dos fragmentos de DNA como se explica en materiales y métodos, y se transformaron bacterias *E.coli*, de la cepa DH5 α . Para identificar las colonias que poseían el inserto, se digirieron con *BamHI* y se identificaron las que poseían el tamaño esperado (5000pb). Se

confirmó la inserción por secuenciación La Figura 6-4 muestra los resultados de las secuencias de DNA y los aminoácidos traducidos.

cp145 SpHCN	KDYPEMGARMAEIAQERLNTIDS	DPTM	YNSHNV	YITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGV
cp146 SpHCN	-----	DPTM	NSHNV	-----
cp147 SpHCN	-----	DPTM	SHNV	-----
cp148 SpHCN	-----	DPTM	HNV	-----
cp149 SpHCN	-----	DPTM	NV	-----
cp150 SpHCN	-----	DPTM	V	-----

Figura 6-4. Inserciones del CNBD en el plásmido pRSET con cpVenus.

6.3 Expresión y purificación de las proteínas quiméricas.

Se expresaron las 12 construcciones (6 construcciones originales de cpVenus y 6 construcciones quiméricas con el CNBD) en bacterias (*E. coli*) de la cepa JM109 (DE3). De acuerdo a la recomendación del Dr. Nagai, se realizó la expresión de la proteína sin agregar IPTG al medio LB líquido durante 4 días con agitación (200 rpm) a temperatura ambiente (22-26 °C). Parece ser que la expresión paulatina en *E. coli* facilita el plegamiento correcto de la proteína e incrementa la eficiencia de expresión de la proteína funcional. Pude notar fácilmente el nivel de expresión de las proteínas gracias al color de la proteína fluorescente (amarillo), aunque, el color fue más tenue que la proteína fluorescente original debido a la permutación circular.

Se extrajeron las proteínas solubles de *E. coli* después de lisar las células por sonicación; se purificaron usando una columna de Ni²⁺ como se describe en métodos. Cuantifiqué la cantidad de cada proteína obtenida por el método de Bradford.

Para confirmar el estado de pureza de las proteínas se corrió un gel SDS acrilamida, en el cual se cargaron 4 ug de proteína con las diferentes construcciones y se pudo observar que el proceso de purificación fue exitoso. Las bandas esperadas se observaron en 32 kDa para las cpVenus sin modificación y 46 o 47 kDa para las proteínas quiméricas (Figura 6-5).

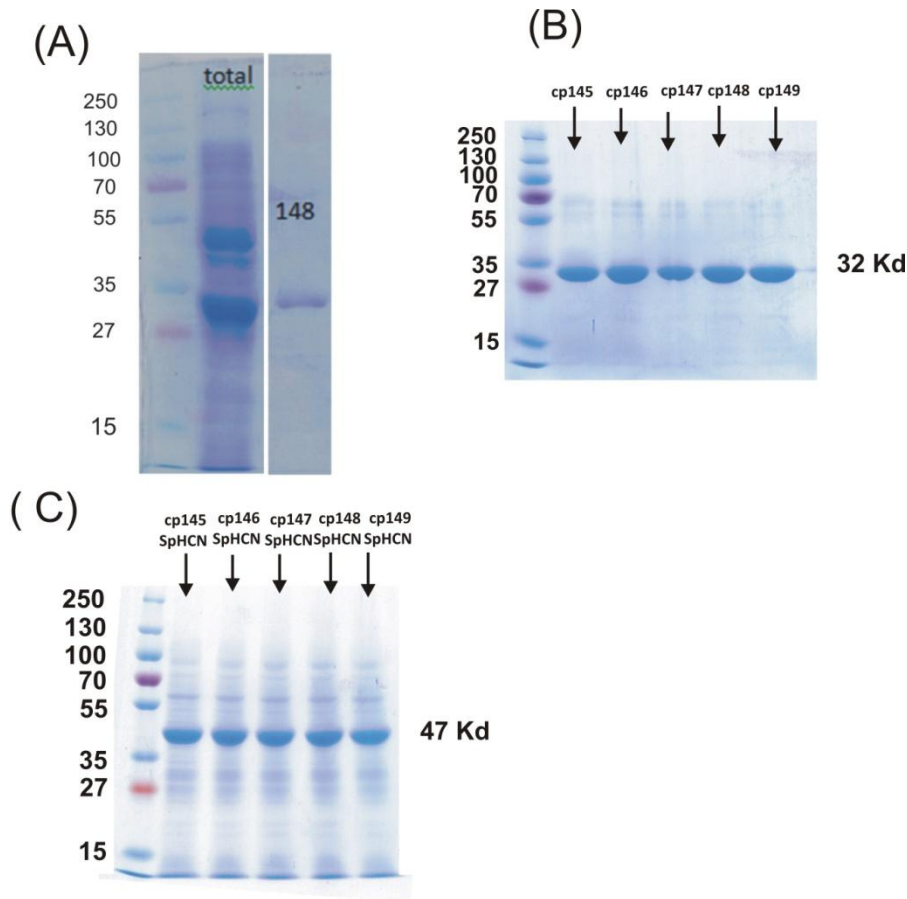


Figura 6-5. Gel de poliacrilamida de las proteínas purificadas. En el panel **A** se muestra la purificación de las proteínas (proteína total y una proteína purificada cp 148). En el panel **B** se muestra un gel de la purificación de las FP, en C se muestra la purificación de las proteínas fluorescentes con el dominio CNBD del canal SpHCN.

6.4 Determinación del espectro de fluorescencia de las proteínas en presencia de AMPc.

Con el objetivo de dilucidar si las proteínas quiméricas podían funcionar como un indicador de la concentración del AMPc, determiné los espectros de fluorescencia de las proteínas en presencia (100 μ M) y ausencia del AMPc. En primer lugar, determiné los espectros de emisión de la fluorescencia y aunque pude observar que la intensidad de la fluorescencia fue variable dependiendo de las proteínas quiméricas, en ninguna de ellas se presentó un cambio considerable en la intensidad o en la forma del espectro. Por tanto, concluí que las proteínas quiméricas construidas son incapaces de detectar cambios en la concentración del AMPc (Figura 6-6).

Posteriormente, determiné los espectros de excitación de las proteínas quiméricas. Esperaba encontrar un pico de excitación entre los 420nm a los 505nm, ya que se ha reportado que una cpFP (la GFP silvestre) muestra dos picos de excitación dentro de

estas longitudes de onda causados por una distorsión en su estructura que afecta el estado de protonación del fluoróforo. Por el contrario, en su espectro de emisión sólo se puede distinguir un pico (Nagai et al., 2001). En las proteínas que construí no pude observar los picos de excitación en las longitudes de onda señaladas (Figura 6-7); no obstante, la forma del espectro de excitación no fue idéntica entre dichas proteínas. Comparando con el espectro de Venus, todas las proteínas presentaron una excitación hacia una longitud de onda más corta (desplazada hacia la izquierda).

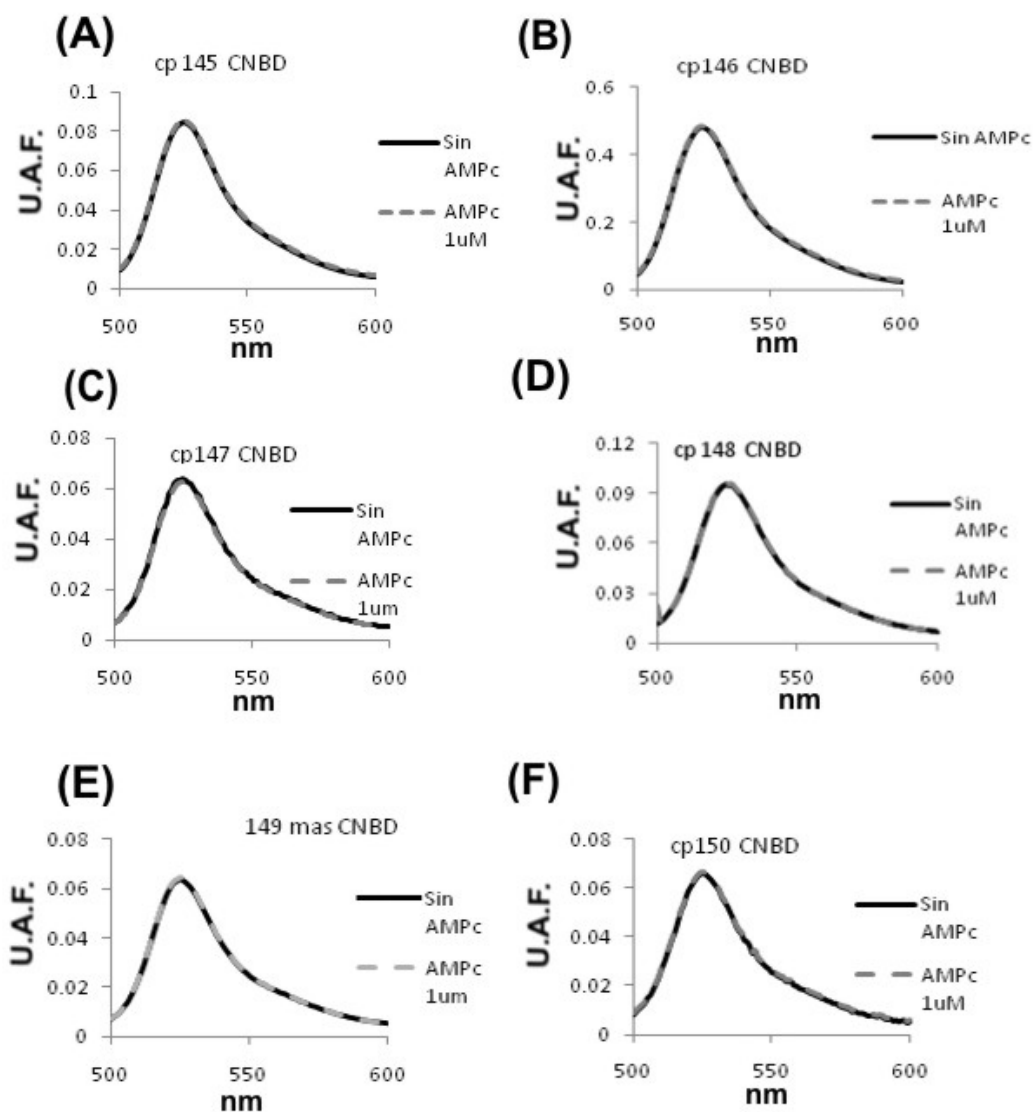


Figura 6-6. Espectro de emisión de la fluorescencia de las proteínas quiméricas. Se determinó el espectro de fluorescencia (ex 485 nm, em 500-600 nm) de las proteínas purificadas (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en presencia y ausencia de AMPc (100 μM). No se observaron cambios en los espectros de emisión en presencia y ausencia de AMPc en todas las proteínas quiméricas.

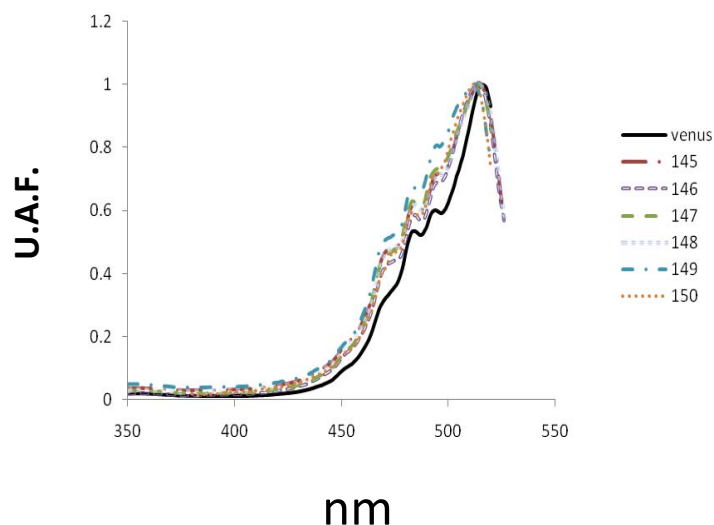


Figura 6-7. Espectro de excitación de la fluorescencia de las proteínas quiméricas con inserto y sin inserto. Las construcciones presentaron un espectro de excitación ligeramente más amplio que el de la proteína Venus. Nótese que a pesar que la mayoría de las cpVenus presentan un pico de absorción en el área de 400 nm, no hay ningún pico de excitación en esta área.

6.5 Determinación del espectro de fluorescencia de las proteínas.

Desafortunadamente, en ninguna de las proteínas quiméricas elaboradas se pudieron registrar variaciones en la intensidad de la fluorescencia al agregar el AMPc, aunque sí se observó que dichas intensidades fueron variables entre las proteínas. Éste hecho sugiere que propiedades de la fluorescencia como el coeficiente de extinción molar (ϵ) y la eficiencia cuántica (ϕ) son distintos para cada proteína quimérica. Por consiguiente, determiné el espectro de absorbancia tanto de las proteínas quiméricas como de cpVenus sin el CNBD.

Como se muestra en Figura 6-8, el espectro de absorbancia en cada proteína fue distinto. Solamente la cp150 tiene un pico de absorbancia cerca de los 510 nm, mientras que las otras proteínas presentan un pico de absorbancia alrededor de los 420 nm. Esta particularidad indica que el grupo fenol del fluoróforo está protonado parcialmente debido a un cambio en el microambiente del fluoróforo. No obstante, como había mencionado previamente, no hubo un pico de excitación alrededor de los 420 nm, sugiriendo que la energía absorbida en este rango de luz no se convirtió en energía de la emisión. Comparado con el valor ϵ de Venus ($92.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), los valores ϵ de las proteínas

preparadas fueron menores, lo cual indica que no se formó bien el fluoróforo en todas las cpVenus y/o que el microambientes del fluoróforo de las cpVenus afecta la eficiencia de absorber la luz.

Tabla 1. Coeficientes de extinción molar (ϵ) de las diferentes construcciones cpVenus con y sin el CNBD de SpHCN2.

	Sin CNBD		Con CNBD	
	ϵ abs1 (nm)*	ϵ abs2 (nm)*	ϵ abs1 (nm)*	ϵ abs2 (nm)*
cp 145	8.8 (418)	19.7 (502)	3.2 (418)	8.3 (502)
cp 146	6.2 (418)	8.2 (508)	8.1 (418)	12.1 (508)
cp 147	6.7 (418)	23.5 (512)	8.2 (418)	19.5 (512)
cp 148	3.1 (420)	15.4 (505)	35.4 (420)	19.7 (510)
cp 149	4.3 (420)	16.6 (510)	3.8 (420)	15.4 (510)
cp 150	<1	22.4 (502)	5.2 (420)	26.3 (511)

Se indican las longitudes de onda de los picos de absorbanza (abs1 y abs2) están indicadas en los paréntesis. *Las unidades de ϵ es $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El ϵ de mVenus es de $92.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

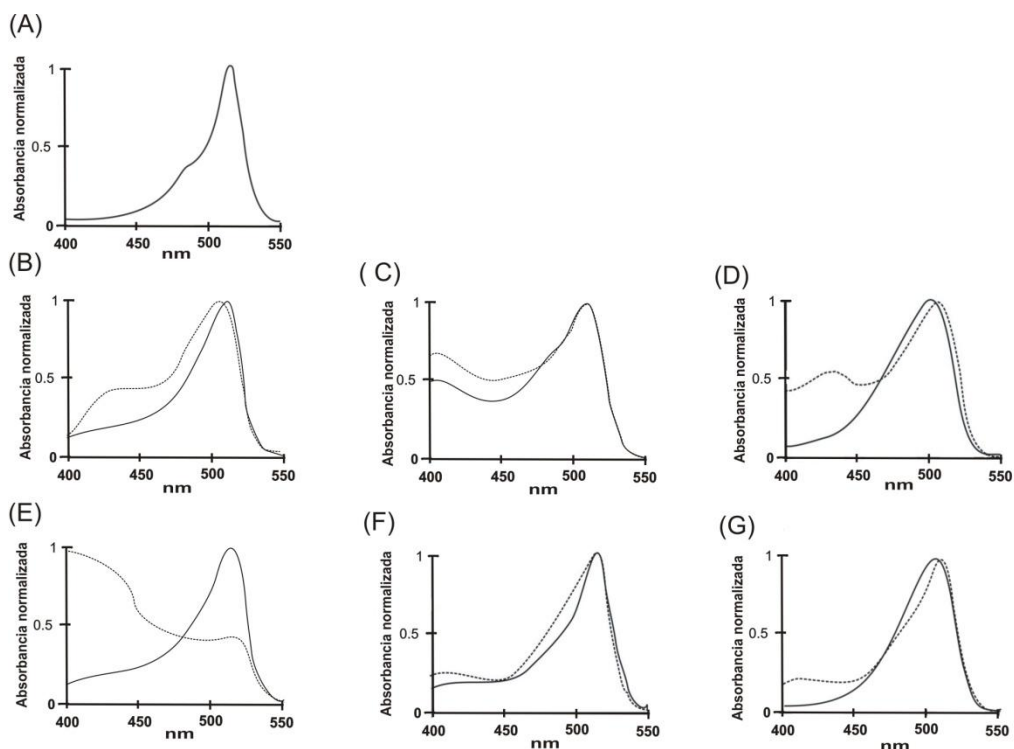


Figura 6-8 Espectro de absorción de las diferentes construcciones de cpVenus con y sin CNBD.

En esta imagen se muestran los espectros de absorción de las proteínas con y sin el CNBD. Se observa que el CNBD afecta el patrón de absorción de las construcciones. En línea continua se muestra la absorción de las proteínas sin inserto y la línea punteada muestra la absorción de las proteínas más el CNBD (A) mVenus, (B) cp145, (C) cp146, (D) cp147, (E) cp148, (F) cp149, (G) cp150.

6.6 Eficiencia cuántica (ϕ) de las proteínas.

También se calculó la ϕ de las cpVenus con y sin el CNBD (Tabla 2). Se observó una disminución en este parámetro en las cpVenus con respecto a mVenus. Sin embargo, no fue evidente un cambio aparente entre los valores de la ϕ con y sin el CNBD.

Tabla 2. Eficiencia cuántica de las proteínas.

Construcción	ϕ	Construcción	ϕ
cp145	0.0092	cp145 CNBD	0.0093
cp146	0.050	cp146 CNBD	0.052
cp147	0.0010	cp147 CNBD	0.0016
cp148	0.011	cp148 CNBD	0.011
cp149	0.0019	cp149 CNBD	0.0021
cp150	0.0064	cp150 CNBD	0.0066

Tabla 2. Eficiencia cuántica de las proteínas. El valor ϕ de la mVenus es de 0.57

6.7 Ensayo de unión del AMPc al CNBD por anisotropía.

Las propiedades de los espectros, como el coeficiente de extinción molar (ϵ) y la eficiencia cuántica (ϕ), tuvieron diferentes valores en las proteínas quiméricas, estos datos indican que cada construcción genera una distorsión distinta en la estructura de la proteína fluorescente o, por lo menos, modifica el microambiente alrededor del fluoróforo. A pesar de ello, no observé ningún cambio en el espectro de fluorescencia al agregar el AMPc. Hay varias posibilidades para explicar estos resultados: 1) el AMPc se une al CNBD de SpHCN2 y altera su estructura, pero este cambio estructural no afecta el microambiente del fluoróforo; 2) el AMPc se une al CNBD, pero no induce un cambio estructural en éste; 3) el AMPc no se une al CNBD. En el presente proyecto, elegí el dominio del CNBD del SpHCN2 asumiendo que funciona como el de SpHCN1 (una regulación alostérica por unión del AMPc al CNBD) aunque no hay evidencia experimental. Por lo anterior, decidí medir la actividad de unión al AMPc de las proteínas quiméricas.

Realicé un ensayo de unión midiendo la anisotropía de un análogo del AMPc fluorescente, 8- $[\phi$ -575]-AMPc (Moll et al., 2008). La anisotropía (r) es un parámetro de la fluorescencia, que da información acerca del movimiento rotacional de una molécula fluorescente. El movimiento rotacional está relacionado al tamaño de la molécula, la viscosidad del medio y la temperatura. Aprovechando esta característica de la fluorescencia, se puede medir la anisotropía en un ensayo de unión ligando-receptor, usando un ligando marcado con un fluoróforo.

El valor de r de 8-[ϕ -575]-AMPc (100 nM) sin proteína fue aproximadamente de 0.05. Este valor subió hasta 0.2 al agregar 1 μ M de EPAC1-camps, la cual tiene el dominio CNBD funcional de EPAC1 (Nikolaev V. *et al* 2004). El incremento de r fue causado por la interacción específica del ligando-receptor, dado que el valor de r se recuperó casi totalmente (0.06) en la presencia de 100 μ M del AMPc que compite por el centro de unión con el 8-[ϕ -575]-AMPc (Figura 6-9). Este resultado indica que el ensayo de unión midiendo la anisotropía funciona bien para confirmar la actividad del CNBD.

En el siguiente ensayo, cuantifiqué el valor r de 8-[ϕ -575]-AMPc (100 nM) con 1 μ M de una proteína quimérica (145cpVenus con CNBD del SpHCN2). El valor r se mantuvo aproximadamente en 0.05 en la ausencia y la presencia de 100 μ M del AMPc, lo cual indica que esta proteína no tiene la función de unirse al AMPc. Experimenté con otra proteína quimérica que contiene el mismo dominio del CNBD (el CNBD del SpHCN2 está insertado entre la ECFP y la cp173Venus) tampoco mostró la actividad de unión específico al AMPc. Éstos resultados indican que el CNBD del SpHCN2 expresado en *E. coli* no se une al AMPc, lo cual explica claramente los resultados de los espectros de la fluorescencia.

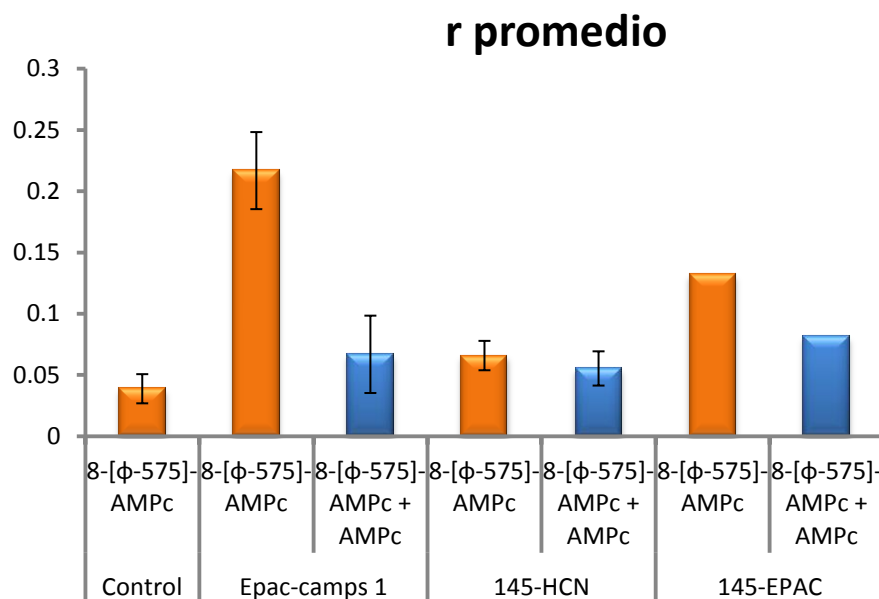


Figura 6-9. Ensayo de unión del 8-[ϕ -575]-AMPc a proteínas usando Anisotropía. El histograma muestra el valor de la anisotropía (r) del AMPc marcado por un fluoróforo (8-[ϕ -575]-AMPc, 100nM). El valor r que se usó de control fue el del 8-[ϕ -575]-AMPc en ausencia de cualquier proteína. Los otros valores son en presencia de las proteínas indicadas (1 μ M de cada proteína purificada). AMPc indica el valor de r en presencia de 100 μ M del AMPc.

7. DISCUSIÓN.

7.1 Expresión de las proteínas modificadas y su purificación.

En el presente proyecto, utilicé el plásmido pRSET (Invitrogen) para expresar las proteínas quiméricas en *E. coli*. Debido al alto número de copias dentro de la bacteria, este plásmido facilitó los procedimientos de la biología molecular para preparar las construcciones planeadas. No obstante, tuve cierta dificultad para expresar las proteínas al principio del proyecto debido a que el IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) no indujo la expresión de las proteínas (esto fue evaluado por la fluorescencia) en BL21(DE3) ni en BL21(DE3)pLysS independientemente de la temperatura a pesar de que el manual del producto lo indica (Invitrogen). Posteriormente, el Dr. Nagai nos enseñó que se puede expresar proteínas con el mismo vector dejando en suspensión de la bacteria transformada por 4 días con agitación en la temperatura ambiente (22-25 °C) sin tratamiento del IPTG, con lo cual logré expresar mis proteínas. Una posible explicación de éstos resultados es que la expresión de la proteína con una velocidad acelerada por el IPTG genera plegamientos incorrectos de la proteína y no se produce el fluoróforo de la cpFP. Actualmente, los miembros del laboratorio utilizan este método para expresar proteínas con el vector pRSET de manera habitual.

La purificación de las proteínas fue relativamente sencilla gracias a la cola de histidinas (6 His en el N-terminal de la proteína) y la columna de Ni²⁺. El color de proteínas fluorescentes facilitó el proceso de purificación aunque las permutaciones circulares de Venus utilizadas tienen un color más tenue comparado a la Venus silvestre. Determiné la coeficiencia de extinción molar de la Venus silvestre purificada y fue de $80 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Este valor es cercano al valor reportado ($92.2 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), comprobando que el sistema de expresión y el proceso de purificación fueron adecuados.

7.2 Efecto del AMPc sobre la fluorescencia de las proteínas quiméricas.

En este trabajo de investigación, desafortunadamente no observé ningún cambio en la fluorescencia al agregar el AMPc a las proteínas quiméricas que preparé. En el caso de las proteínas quiméricas con el dominio del SpHCN2, el nulo cambio de la fluorescencia se debe al hecho de que las construcciones no se unen al AMPc. Existen varias posibilidades que pueden explicar los resultados. Por un lado, el dominio CNBD del SpHCN2 podría no plegarse en una estructura correcta. Se ha reportado anteriormente que una región extra del N-terminal del CNBD de EPAC1 (de aproximadamente 170

aminoácidos) es necesario para la estabilidad y la función del dominio cuando se expresa esta proteína en bacterias. (Kraemer et al., 2001). En el caso de que el dominio del SpHCN2 presente la misma característica que EPAC1, se podría producir un dominio correctamente plegado seleccionando una región más grande del CNBD que sea funcional.

Por otro lado, también existe la posibilidad de que, aunque se pliegue bien y forme la estructura correcta, el CNBD del SpHCN2 no tendría la capacidad de unirse al AMPc. Relacionado con esto, recientemente se publicó un artículo sobre la función del dominio CNBD de los canales iónicos ERG y EAG (Brelidze et al., 2009). Los canales ERG y EAG de K⁺ dependientes de voltaje que participan en la regulación ritmo cardiaco y tienen un dominio CNBD en su C-terminal como el canal HCN. Aunque, no se ha reportado la regulación de los canales ERG y EAG por nucleótidos cíclicos, a pesar de que tienen el dominio CNBD. Por lo anterior, (Brelidze et al., 2009) se exploró la función del CNBD de los canales hERG1 (ERG1 de humano) y mEAG1 (EAG1 de ratón) expresando el dominio en bacterias. Datos espectroscópicos de dicroísmo circular indican que los dominios del CNBD de hERG1 y mEAG1 forman estructuras parecidas al CNBD del canal mHCN2 (HCN2 de ratón), confirmando que los plegamientos son correctos en los dominios aun cuando se expresan en *E. coli*. Sin embargo, el dominio de mEAG no mostró la actividad de unión a los nucleótidos cíclicos, mientras que el dominio de hERG manifestó la actividad (Kd al AMPc: 50 uM). Este reporte indica que la homología de la secuencia de aminoácidos no es suficiente para predecir la función del CNBD. En caso de SpHCN2, no se sabe si los nucleótidos cíclicos modulan la actividad del canal debido a que no hay estudios funcionales de este canal. Por lo tanto, en este momento, no se sabe si el CNBD del SpHCN2 es como el caso de EPAC1 (el dominio es funcional pero requiere aminoácidos extra para la estabilidad del dominio) o el caso del mEAG1 (un dominio engañoso).

Recientemente, salió un reporte sobre la estimación de los cambios conformacionales del CNBD del canal mHCN2 al unirse al AMPc, usando FRET intramolecular con metales de transición, Ni²⁺ y Cu²⁺. (Taraska et al., 2009). Ellos encontraron que no ocurre un cambio grande de la posición de la tapa del CNBD al unirse al AMPc. Esto explica porque un sensor de FRET para el AMPc, usando el CNBD de mHCN2, no tiene un gran cambio en la señal de fluorescencia (Nikolaev et al., 2004). Considerando toda la información, el CNBD del SpHCN2 no fue un dominio adecuado para aplicar en el desarrollo del sensor fluorescente para el AMPc.

En este estudio, construimos una proteína quimérica con el CNBD de la proteína EPAC1 y cp145Venus como un experimento extra. Aunque esta proteína sí mostró la actividad de unión al AMPc, no presentó un cambio en su fluorescencia, de esto se puede deducir que el cambio de la conformación del CNBD del EPAC1 no fue suficiente para generar un cambio en el microambiente del fluoróforo de la cpVenus. Hasta ahora, el único sensor funcional que usa una sola proteína fluorescente con un solo enlace covalente entre el dominio de la proteína funcional y la proteína fluorescente es “FlnG” (un sensor para el GMPc, Figura 2-4 D), los demás tienen 2 enlaces covalentes entre ellas. Para que un cambio conformacional de una proteína genere una distorsión a la estructura de la proteína fluorescente y afecte el microambiente del fluoróforo, 2 enlaces covalentes entre ellas probablemente tienen cierta ventaja. En caso de FlnG, posiblemente ocurre un gran cambio conformacional al unirse al GMPc porque FlnG utiliza dos dominios del CNBD que se encuentran en la PKG, lo cual ayudó a modificar la estructura del barril β de la proteína fluorescente y/o el microambiente del fluoróforo.

7.3 Propiedad espectroscópica de las proteínas expresadas.

De acuerdo con uno de los objetivos particulares del proyecto, determiné las propiedades espectroscópicas de las proteínas para obtener información sobre cada permutación circular de Venus (cpVenus). Los espectros de absorbancia de las proteínas fueron variables (Figura 6-8) aunque comparten una característica común. Las cpVenus presentaron una disminución en su coeficiente de extinción molar en la región de los 510 nm de aproximadamente 4 veces con respecto a la proteína Venus. Por otro lado, las cpVenus, excepto por cp150, presentaron un incremento en la absorbancia alrededor de los 400 nm, que corresponde con la absorbancia del grupo fenol protonado del fluoróforo. La Venus y otras isoformas de GFP que tienen solamente un pico de absorbancia alrededor de 500 nm, como EGFP y EYFP, tienen el fluoróforo con un grupo fenol ionizado en el pH neutral por sustitución de una serina por una treonina en la posición 64. La sustitución de aminoácido genera un microambiente especial para que el fluoruro tenga solamente el grupo fenol ionizado dentro del barril β de la proteína. Las permutaciones circulares alrededor de 145 de EGFP y EYFP (Venus) generalmente causan un cambio en el microambiente del fluoróforo y pierden el equilibrio para mantener el grupo fenol ionizado (Baird et al., 1999; Nagai et al., 2001) En el caso de cp150Venus, el microambiente del fluoróforo fue posiblemente parecido a la Venus silvestre debido a

que esta posición está más lejos del fluoróforo dentro de las mutaciones utilizadas en el proyecto (Figura 6-1 A).

Una observación importante sobre los espectros de absorbancia es que cada construcción posee un espectro de absorción específico, sugiriendo que la idea general del proyecto es correcta; es decir que un cambio en las proteínas afecta el microambiente del fluoróforo de las cpVenus.

Respecto al pico y la forma de la absorbancia alrededor de los 500 nm, todas las cpVenus tienen un pico ligeramente más corto que el de la Venus silvestre (515 nm) y formas más anchas hacia el color azul. El pico de absorbancia de la proteína Venus (y otros EYFPs) está desplazado hacia la longitud de onda más larga que la de EGFP debido a que la sustitución de la treonina por la tirosina en la posición 203 genera un agrupamiento $\pi-\pi$ entre los anillos aromáticos del fluoróforo y la tirosina 203 (Tsien R., 1998). El desplazamiento de absorbancia hacia color azul de los cpVenus indica que una posible pérdida del agrupamiento $\pi-\pi$, lo cual sugiere que existe una distorsión en la estructura de barril β en las cpVenus.

A pesar de la gran variedad en la forma de los espectros de absorbancia de las proteínas, la forma de emisión de la fluorescencia fue prácticamente igual. Esto fue una propiedad particular de las proteínas construidas porque existen ejemplos de cpFPs que cambian ligeramente la longitud de la onda del pico de emisión dependiendo de la construcción (Baird et al., 1999; Nagai et al., 2001). Respecto a los espectros de excitación, no observé ningún pico de excitación alrededor de los 400 nm, aunque la mayoría de las proteínas presentaron un pico de absorbancia (o incremento de absorbancia sin un pico claro) en este rango. Algunos indicadores basados en cpFP tienen un pico de excitación en esta longitud de onda (Nagai et al., 2001; Nausch et al., 2008) mientras que los que no lo tienen muestran un pico de absorbancia en el mismo rango (Souslova et al., 2007). Por lo tanto, no hay reglas generales sobre la relación de un pico de excitación alrededor de los 400 nm y la emisión de la fluorescencia.

Todas las proteínas que preparamos mostraron un pico de excitación grande alrededor de los 510 nm junto con picos secundarios. Mientras que las longitudes de onda de los picos secundarios son iguales que los de la Venus silvestre, los picos principales de las cpVenus fueron ligeramente más cortas que el de la Venus.

7.4 Eficiencia cuántica de las proteínas expresadas.

Las proteínas preparadas en este proyecto presentaron bajas eficiencias cuánticas (< 0.05) que generalmente fueron variables; aunque, cabe destacar que los valores de la eficiencia cuántica entre las proteínas que comparten la misma cpVenus (con y sin el CNBD de SpHCN2) son prácticamente idénticos a pesar de que el perfil de los espectros de absorbancia son diferentes (Tabla 2).

El fluoróforo de la Venus (y de la GFP) es un fenol unido a un grupo imidazolinona (Figura 2-3), este compuesto no es fluorescente en solución debido a la flexibilidad del enlace entre dos grupos. Un reporte reciente mostró que dos anillos tienen que estar en un mismo plano para que el compuesto tenga fluorescencia (Baldrige et al., 2010; Wu and Burgess, 2008). La alta eficiencia cuántica de la Venus (y EGFP) indica que el barril β de la proteína fluorescente genera un ambiente especial en el que la orientación de dos anillos permanece casi en un plano.

En este proyecto, construí proteínas quiméricas con el CNBD del SpHCN2 y la cpVenus usando la enzima de restricción, BamHI. En consecuencia, todas las cpVenus, independientemente de la inserción del CNBD, tienen los mismos 3 aminoácidos (DPT) en el N-terminal de las proteínas. Adicionalmente, las construcciones originales de cpVenus tienen una metionina extra en sus N-terminales, entonces, todas las proteínas expresadas en este estudio tienen 4 aminoácidos comunes (DPTM) en el N-terminal de cada cpVenus. Estos 4 aminoácidos, que residen más cerca del fluoróforo, probablemente determinaron la eficiencia cuántica del fluoróforo afectando la flexibilidad del enlace entre dos anillos del fluoróforo. Considerando que la prolina es un aminoácido que destruye la estructura secundaria como la α hélice y la β plegada, este aminoácido podría ser inadecuado para la unión del dominio. Las proteínas que se unieron a los 4 aminoácidos (el péptido: MTGGQQMGRDLYDDDDK o el CNBD del SpHCN2) prácticamente no participaron en la eficiencia cuántica del fluoróforo aunque sí afectaron el coeficiente de extinción molar (absorbancia del fluoróforo). Los aminoácidos que se sitúan cerca de la unión al cpFPs parecen ser fundamentales para obtener un buen indicador fluorescente (Souslova et al., 2007). Considerando que todas las proteínas expresadas en este estudio tienen una baja eficiencia cuántica (< 0.05) en comparación a la original (0.57), es importante escoger los aminoácidos de la unión que no bajen tanto la eficiencia cuántica del fluoróforo.

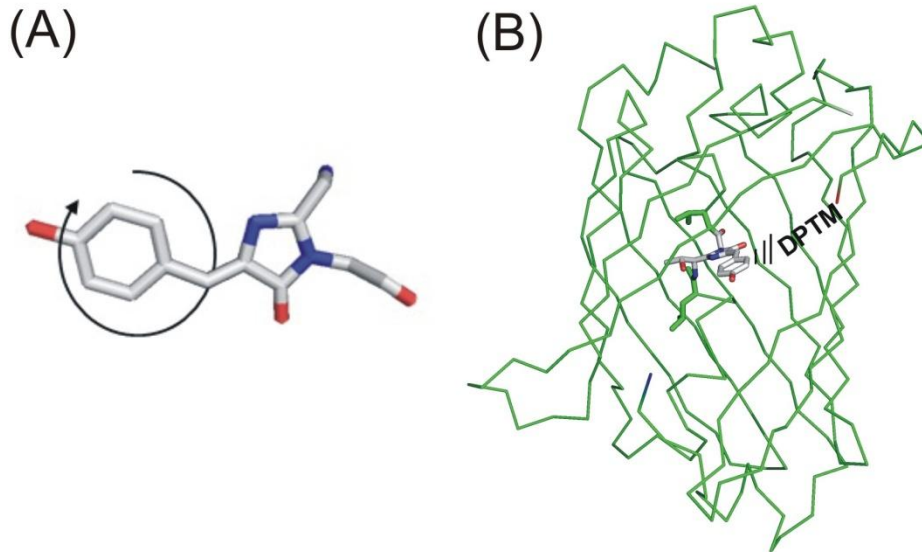


Figura 7-1. Dibujo que muestra la posible interacción del péptido DPTM y el fluoróforo de la cpVenus. En A se muestra la capacidad de rotación que posee la molécula del fluoróforo en estado libre (sin interactuar con el barril β). En B se muestra la interacción con el péptido DPTM con el fluoróforo, afectando su capacidad de rotar y en consecuencia la fluorescencia.

7.5 Ensayo de unión del AMPc mediante la técnica de anisotropía.

Los intentos de desarrollar indicadores fluorescentes para el AMPc usando el dominio CNBD del SpHCN2 no fueron exitosos, tanto en el presente proyecto como en otros proyectos del grupo; ya que en ninguno se observaron variaciones en la intensidad de la fluorescencia al agregar el AMPc. Esta situación me condujo a realizar un ensayo de unión del AMPc al dominio CNBD del SpHCN2. Utilizando un análogo fluorescente de AMPc, el 8-[ϕ -575]-AMPc, realizamos un ensayo de unión midiendo el cambio en su anisotropía. Las longitudes de onda de excitación y emisión del 8-[ϕ -575]-AMPc son más largas que aquellas de la Venus, permitiendo realizar el ensayo de unión sin interferir con la fluorescencia de la Venus, asimismo permite que este ensayo sea muy rápido y preciso. El valor de la anisotropía (r) del 8-[ϕ -575]-AMPc se incrementó notablemente en presencia de EPAC1-camps, que se usó como un control positivo, pero el valor de r no se incrementó con el CNBD (SpHCN2)-cp145Venus, una de las proteínas quiméricas que preparé. Experimenté con las otras construcciones que contienen el CNBD del SpHCN2 pero en ninguna de ellas se incrementó el valor de r del 8-[ϕ -575]-AMPc. Para confirmar

los resultados de la anisotropía, elaboré un ensayo de unión por separación mecánica, utilizando la resina de la columna de Ni^{2+} como soporte para las proteínas, mezclé las proteínas con 8-[ϕ -575]-AMPc en un tubo de centrifuga y recuperé el sobrenadante como la fracción no unida del análogo después de la centrifugación. Determiné la intensidad de la fluorescencia del 8-[ϕ -575]-AMPc en presencia y ausencia del exceso del AMPc y obtuve los resultados esperados; la intensidad de la fluorescencia del sobrenadante disminuyó solamente con EPAC1-camps en la ausencia del exceso del AMPc. Este experimento fue mucho más laborioso que los experimentos de anisotropía debido a que requiere un proceso de la separación. La técnica de anisotropía no solamente tiene la ventaja de la rapidez sino también nos permite realizar un experimento de unión en tiempo real, que es de utilidad para determinar la cinética de la unión y la disociación.

Realicé el ensayo de unión en al final del proyecto y encontramos que el dominio CNBD de SpHCN2 no funcionó como se esperaba. Esto fue una sorpresa y un gran error por no haber determinado en el inicio del mismo. Sin embargo, establecí el ensayo de unión con 8-[ϕ -575]-AMPc mediante la técnica de anisotropía; este método permite determinar la actividad del CNBD de manera muy rápida y precisa. Para desarrollar indicadores fluorescentes para el AMPc, se debería de realizar el ensayo de unión mediante la técnica de anisotropía antes de preparar varias construcciones de proteínas quiméricas ya que facilitará este proceso.

8. CONCLUSIÓN.

1. Preparé 6 construcciones de plásmido que codifican proteínas quiméricas uniendo el CNBD del SpHCN2 al N-terminal de 6 diferentes cpVenus.
2. Expresé las 6 proteínas quiméricas en la cepa de *E.coli* JM109 (DE3) y preparé las proteínas purificadas a través de la columna de Ni²⁺.
3. Determiné los espectros de fluorescencia de todas las proteínas quiméricas en la presencia y la ausencia del AMPc, y desafortunadamente no se observó ningún cambio por el AMPc.
4. Realicé el ensayo de unión específica entre unas proteínas que contienen el CNBD de SpHCN2 (ó el CNBD de EPAC1) y un análogo del AMPc fluorescente a través del método de anisotropía y se observó que el CNBD de SpHCN2 no tiene la capacidad de unirse al análogo del AMPc.
5. Determiné los espectros de absorbancia y de fluorescencia (excitación y emisión) de 6 proteínas quiméricas preparadas y 6 cpVenus sin el dominio CNBD. Se observó, en todas las proteínas, una disminución de los valores del coeficiente de extinción molar (ϵ) y la eficiencia cuántica (ϕ) comparados con la proteína Venus. Notablemente, los valores del ϵ se cambiaron por la inserción del CNBD mientras que los valores de la ϕ fueron constantes entre las proteínas con y sin el CNBD en cada cpVenus. Los cambios de los valores ϵ por la inserción del CNBD indican que hay cambios en el microambiente del fluoróforo por la inserción, el cual es un índice positivo de la estrategia para obtener un indicador fluorescente funcional.
6. Preparé una proteína quimérica uniendo el CNBD de EPAC1 al N-terminal de la cp145Venus. Sin embargo, no hubo ningún cambio en el espectro de la fluorescencia al agregar el AMPc a la proteína quimérica. Éste resultado indica que se requiere alterar los aminoácidos que se sitúan en el N-terminal de una cpVenus (una liga entre un CNBD y la cpVenus), el cual interactúa con el fluoróforo de la proteína fluorescente, para incrementar la eficiencia cuántica del fluoróforo.

9. PERSPECTIVAS.

1. Es necesario averiguar si el dominio CNBD de SpHCN2 expresado en este proyecto tiene un plegamiento correcto a través de espectrometría de dicroísmo circular. En el caso de que tenga el plegamiento correcto, el CNBD del SpHCN podría ser un dominio falso como el dominio que se encuentra en el canal de K⁺ tipo EAG.
2. En caso de que el CNBD del SpHCN2 no tenga un plegamiento correcto, es necesario expresar el mismo dominio con péptidos extendidos hacia el N- y C- terminal para averiguar la estabilidad del dominio. Ya se ha observado que el CNBD de la proteína EPAC1 requiere un péptido extra en su N-terminal para el plegamiento estable.
3. Se debe averiguar el tamaño y la secuencia de aminoácidos que funcione como una liga adecuada entre un dominio CNBD y una cpVenus, ya que la secuencia DPTM que utilizamos causó una disminución grande sobre la eficiencia cuántica del fluoróforo.
4. Hay que probar un dominio CNBD que presente un cambio conformacional más fuerte que el del canal SpHCN2. Este puede ser el de la proteína EPAC1 o PKA.

REFERENCIAS.

- Abedi, M. R., Caponigro, G., and Kamb, A. (1998). Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides. *Nucleic Acids Res* **26**, 623-30.
- Adams, S. R., Harootunian, A. T., Buechler, Y. J., Taylor, S. S., and Tsien, R. Y. (1991). Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature* **349**, 694-7.
- Ataka, K., and Pieribone, V. A. (2002). A genetically targetable fluorescent probe of channel gating with rapid kinetics. *Biophys J* **82**, 509-16.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (1999). Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11241-6.
- Baldrige, A., Samanta, S. R., Jayaraj, N., Ramamurthy, V., and Tolbert, L. M. (2010). Activation of fluorescent protein chromophores by encapsulation. *J Am Chem Soc* **132**, 1498-9.
- Beavo, J. A., and Brunton, L. L. (2002). Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 710-8.
- Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Tersikh, A. V., and Lukyanov, S. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* **3**, 281-6.
- Berg, J., Hung, Y. P., and Yellen, G. (2009). A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio. *Nat Methods* **6**, 161-6.
- Berrera, M., Dodoni, G., Monterisi, S., Pertegato, V., Zamparo, I., and Zacco, M. (2008). A Toolkit for Real-Time Detection of cAMP: Insights into Compartmentalized Signaling. In "Protein-Protein Interactions as New Drug Targets" (E. Klusmann and J. Scott, Eds.), Vol. 186, pp. 285-298. Springer Berlin Heidelberg.
- Bos, J. L. (2003). Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 733-8.

- Branham, M. T., Mayorga, L. S., and Tomes, C. N. (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J Biol Chem* **281**, 8656-66.
- Brelidze, T. I., Carlson, A. E., and Zagotta, W. N. (2009). Absence of direct cyclic nucleotide modulation of mEAG1 and hERG1 channels revealed with fluorescence and electrophysiological methods. *J Biol Chem* **284**, 27989-97.
- Chen, Y., Cann, M. J., Litvin, T. N., Iourgenko, V., Sinclair, M. L., Levin, L. R., and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**, 625-8.
- Day, R. N., and Davidson, M. W. (2009). The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev* **38**, 2887-921.
- DiPilato, L. M., Cheng, X., and Zhang, J. (2004). Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16513-8.
- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A., Robben, T. J., Strik, A. M., Kuil, C., Philipsen, R. L., van Duin, M., Conti, M., and Gossen, J. A. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2993-8.
- Frommer, W. B., Davidson, M. W., and Campbell, R. E. (2009). Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem Soc Rev* **38**, 2833-41.
- Galindo, B. E., Neill, A. T., and Vacquier, V. D. (2005). A new hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channel from sea urchin sperm flagella. *Biochem Biophys Res Commun* **334**, 96-101.
- Gauss, R., Seifert, R., and Kaupp, U. B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**, 583-7.
- Guerrero, G., Siegel, M. S., Roska, B., Loots, E., and Isacoff, E. Y. (2002). Tuning FlaSh: redesign of the dynamics, voltage range, and color of the genetically encoded optical sensor of membrane potential. *Biophys J* **83**, 3607-18.

- Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J. H., Kopf, G. S., Suarez, S. S., Levin, L. R., Williams, C. J., Buck, J., and Moss, S. B. (2005). The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* **9**, 249-59.
- Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E. M., Levin, L. R., Buck, J., and Steegborn, C. (2006). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol* **362**, 623-39.
- Kaupp, U. B., and Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* **63**, 235-57.
- Kraemer, A., Rehmann, H. R., Cool, R. H., Theiss, C., de Rooij, J., Bos, J. L., and Wittinghofer, A. (2001). Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1. *J Mol Biol* **306**, 1167-77.
- Lakowicz, J. R. (1999). Principles of Fluorescence Spectroscopy.
- Lakowicz, J. R. (2006). "Principles of fluorescence spectroscopy." Springer, New York.
- Landa, L. R., Jr., Harbeck, M., Kaihara, K., Chepurny, O., Kitiphongspattana, K., Graf, O., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., Holz, G. G., and Roe, M. W. (2005). Interplay of Ca²⁺ and cAMP signaling in the insulin-secreting MIN6 beta-cell line. *J Biol Chem* **280**, 31294-302.
- Mehats, C., Andersen, C. B., Filopanti, M., Jin, S. L., and Conti, M. (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab* **13**, 29-35.
- Moll, D., Prinz, A., Brendel, C. M., Berrera, M., Guske, K., Zaccolo, M., Genieser, H. G., and Herberg, F. W. (2008). Biochemical characterization and cellular imaging of a novel, membrane permeable fluorescent cAMP analog. *BMC Biochem* **9**, 18.
- Morisawa, M. (1994). Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoolog Sci* **11**, 647-62.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90.

- Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S., and Miyawaki, A. (2001). Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3197-202.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **19**, 137-41.
- Nausch, L. W., Ledoux, J., Bonev, A. D., Nelson, M. T., and Dostmann, W. R. (2008). Differential patterning of cGMP in vascular smooth muscle cells revealed by single GFP-linked biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 365-70.
- Nikolaev, V. O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A., and Lohse, M. J. (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**, 37215-8.
- Ponsioen, B., Zhao, J., Riedl, J., Zwartkuis, F., van der Krogt, G., Zaccolo, M., Moolenaar, W. H., Bos, J. L., and Jalink, K. (2004). Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep* **5**, 1176-80.
- Rehmann, H., Das, J., Knipscheer, P., Wittinghofer, A., and 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., and Bos, J. L. (2007). Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 63-73.
- Sakaguchi, R., Endoh, T., Yamamoto, S., Tainaka, K., Sugimoto, K., Fujieda, N., Kiyonaka, S., Mori, Y., and Morii, T. (2009). A single circularly permuted GFP sensor for inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphate based on a split PH domain. *Bioorg Med Chem* **17**, 7381-6.
- Souslova, E. A., Belousov, V. V., Lock, J. G., Stromblad, S., Kasparov, S., Bolshakov, A. P., Pinelis, V. G., Labas, Y. A., Lukyanov, S., Mayr, L. M., and Chudakov, D. M. (2007). Single fluorescent protein-based Ca²⁺ sensors with increased dynamic range. *BMC Biotechnol* **7**, 37.

- Su, Y. H., Chen, S. H., Zhou, H., and Vacquier, V. D. (2005). Tandem mass spectrometry identifies proteins phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase when sea urchin sperm undergo the acrosome reaction. *Dev Biol* **285**, 116-25.
- Taraska, J. W., Puljung, M. C., Olivier, N. B., Flynn, G. E., and Zagotta, W. N. (2009). Mapping the structure and conformational movements of proteins with transition metal ion FRET. *Nat Methods* **6**, 532-7.
- Tasken, K., and Aandahl, E. M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* **84**, 137-67.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-44.
- Wayman, C., Phillips, S., Lunny, C., Webb, T., Fawcett, L., Baxendale, R., and Burgess, G. (2005). Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *Int J Impot Res* **17**, 216-23.
- Wu, L., and Burgess, K. (2008). Syntheses of highly fluorescent GFP-chromophore analogues. *J Am Chem Soc* **130**, 4089-96.
- Zaccolo, M., De Giorgi, F., Cho, C. Y., Feng, L., Knapp, T., Negulescu, P. A., Taylor, S. S., Tsien, R. Y., and Pozzan, T. (2000). A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat Cell Biol* **2**, 25-9.
- Zaccolo, M., and Pozzan, T. (2002). Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* **295**, 1711-5.
- Zippin, J. H., Farrell, J., Huron, D., Kamenetsky, M., Hess, K. C., Fischman, D. A., Levin, L. R., and Buck, J. (2004). Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J Cell Biol* **164**, 527-34.